

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacología**



**PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE Y DOPAMINÉRGICO EN  
LA VULNERABILIDAD, DEPENDENCIA Y TRATAMIENTO  
DEL ALCOHOLISMO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

José María Oliva de las Heras

Bajo la dirección de los doctores

Jorge Manzanares Robles

Tomás Palomo Álvarez

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2515-5**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Farmacología  
(Farmacología General y Aplicada, Farmacodinamia, Farmacognosia)



# **PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE Y DOPAMINÉRGICO EN LA VULNERABILIDAD, DEPENDENCIA Y TRATAMIENTO DEL ALCOHOLISMO**

Directores:  
Jorge Manzanares Robles  
Tomás Palomo Álvarez

MEMORIA  
Que para optar a  
DOCTOR EN FARMACIA

presenta

**JOSÉ MARÍA OLIVA DE LAS HERAS**

Madrid, 2004



Quiero expresar mi agradecimiento:

A mis directores de Tesis por su ayuda en la realización de este trabajo.

A José Ángel por su amistad sincera y ayuda desinteresada en todo momento.

A los que han colaborado activamente y apoyado moralmente a la finalización de este trabajo sin pedir nada a cambio.

A mi familia por su constante interés y aliento durante todo este periodo de realización del doctorado en los momentos buenos y lo más importante en los momentos malos.

Por último, pero no por eso menos importante, a Noemí, con la que he pasado algunas de las alegrías reportadas por el conjunto de esta Tesis pero que ha tenido que sufrir todos los sin sabores ocasionados por las "circunstancias". Espero que a partir de ahora todo sea distinto y compartamos sólo alegrías ante el futuro esperanzador que se abre ante esta nueva situación. Este es el primer paso de un largo camino que quiero recorrer contigo y se que tu ayuda y aliento no me faltaran. Gracias.

*"El cerebro humano es como una máquina de acuñar moneda.  
Si echas en ella metal impuro, obtendrás escoria  
si echas oro, obtendrás moneda de ley."*

**SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL**

## *Índice*

<b>Alcohol e Historia .....</b>	<b>1</b>
<b>Farmacología del Etanol .....</b>	<b>9</b>
<b>1. <i>Farmacocinética del etanol</i>.....</b>	<b>9</b>
<i>1.1. Absorción .....</i>	<i>10</i>
<i>1.2. Distribución .....</i>	<i>11</i>
<i>1.3. Metabolismo y eliminación.....</i>	<i>11</i>
<b>2. <i>Farmacodinamia del etanol</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>3. <i>Acciones farmacológicas del etanol</i> .....</b>	<b>18</b>
<i>3.1. Sistema Nervioso Central .....</i>	<i>18</i>
<i>3.2. Aparato Digestivo .....</i>	<i>20</i>

3.3. Aparato Respiratorio .....	20
3.4. Aparato cardiovascular .....	21
3.5. Sistema hematopoyético .....	21
3.6. Aparato urogenital .....	22
3.7. Efectos teratógenos.....	22
<b>El Etanol y el Sistema Opiode Endógeno .....</b>	<b>23</b>
1. <i>El sistema opioide endógeno</i> .....	23
1.1. Biosíntesis de los péptidos opioides .....	25
1.1.1. Beta-endorfina.....	25
1.1.2. Encefalinas .....	26
1.1.3. Dinorfínas.....	27
1.2. Distribución de los ARNm de los péptidos opioides .....	27
1.2.1. Proopiomelanocortina .....	27
1.2.2. Proencefalina.....	28
1.2.3. Prodinorfina.....	29
1.3. Receptores opioides .....	29
2. <i>Interacción etanol-sistema opioide endógeno</i> .....	32
2.1. Interacción etanol-péptidos opioides endógenos .....	32
2.1.1. Etanol y el sistema endorfinérgico.....	32
2.1.2. Etanol y el sistema encefalinérgico.....	37
2.1.3. Etanol y el sistema dinorfinérgico .....	39
2.2. Interacción etanol-receptores opioides .....	40
<b>El Etanol y el Sistema Dopaminérgico.....</b>	<b>44</b>
1. <i>Biosíntesis de la dopamina. La tirosina hidroxilasa</i> .....	44
2. <i>Receptores dopaminérgicos</i> .....	46
2.1. Receptor dopaminérgico D1.....	47
2.2. Receptor dopaminérgico D2.....	47
2.3. Receptor dopaminérgico D3.....	48
2.4. Receptor dopaminérgico D4.....	49

2.5. Receptor dopaminérgico D5.....	49
3. <i>Interacción etanol-sistema dopaminérgico</i> .....	50
<b>Modelos Experimentales del Alcoholismo</b> .....	55
1. <i>Modelos motivacionales de consumo de etanol</i> .....	57
1.1. <i>Modelos animales de auto administración de etanol</i> .....	57
1.1.1. Modelo preferencial de consumo de etanol. ....	57
1.1.2. Auto administración por condicionamiento operante .....	60
1.1.3. Auto administración de etanol con fases de abstinencia forzada.....	62
1.1.4. Modelo de readquisición de la conducta.....	63
2. <i>Modelos animales de condicionamiento</i> .....	65
2.1. <i>Modelo de condicionamiento preferencial al sitio</i> .....	65
2.2. <i>Modelo de condicionamiento preferencial al sabor</i> .....	67
3.- <i>Modelos genéticos</i> .....	68
3.1. <i>Modelos transgénicos</i> .....	68
3.2. <i>Modelos animales desprovistos de genes o con genes mutados</i> .....	69
<b>La Terapéutica del Alcoholismo</b> .....	72
1. <i>El síndrome de abstinencia alcohólico</i> .....	72
1.1. <i>Neurotransmisores en el síndrome de abstinencia</i> .....	74
1.1.1. Complejo del receptor GABA <sub>A</sub> .....	74
1.1.2. Agonistas esteroideos del receptor GABA <sub>A</sub> .....	76
1.1.3. Complejo del receptor NMDA.....	77
1.1.4. Canales voltaje-dependientes de calcio .....	79
2. <i>Tratamiento del alcoholismo</i> .....	80
2.1. <i>Tratamiento farmacológico del síndrome de abstinencia por etanol</i> .....	80
2.1.1. Clometiazol .....	81
2.1.2. Tetrabramato .....	81
2.1.3. Tiapride .....	82
2.1.4. Benzodiacepinas.....	82

2.1.5. Otros fármacos .....	83
2.2. Tratamiento coadyuvante del síndrome de abstinencia por etanol .....	84
2.3. Fármacos para la prevención de recaídas .....	85
2.4. Fármacos antidipsotrópicos, aversivos e interdictores .....	86
2.4.1. Disulfiram .....	87
2.4.2. Cianamida cálcica .....	87
2.5. Fármacos que disminuyen el deseo y la compulsión por la bebida .....	88
2.5.1. Naltrexona .....	89
2.5.2. Acamprosato .....	91
2.5.3. Tiapride .....	92
2.5.4. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)....	93
<b>Planteamiento de la Investigación .....</b>	<b>95</b>
<b>Hipótesis de Trabajo .....</b>	<b>99</b>
<b>Objetivos de la Investigación.....</b>	<b>101</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>103</b>
1. Animales de experimentación .....	103
2. Fármacos y compuestos utilizados .....	104
2.1. Procedimientos histológicos.....	104
2.2. Procedimientos histoquímicos .....	104
a) Histoquímica por Hibridación “in situ” .....	104
b) Fijación de [ <sup>35</sup> S]GTPγS estimulada por DAMGO.....	105
3. Procedimientos histológicos .....	106
3.1. Cortes de cerebro e hipófisis en criostato .....	106
3.2. Tinciones histológicas .....	106
4. Procedimientos histoquímicos .....	107
4.1. Histoquímica por Hibridación “in situ” .....	107

a) Preparación del tejido .....	107
b) Marcaje de la sonda .....	107
c) Prehibridación .....	109
d) Hibridación .....	109
e) Posthibridación.....	110
f) Autorradiografía .....	111
4.2. Funcionalidad de receptores acoplados a proteínas G: fijación de [ <sup>35</sup> S]GTPγS estimulada por DAMGO.....	111
a) Estabilización .....	111
b) Preincubación.....	115
c) Incubación.....	115
d) Lavados .....	115
e) Autorradiografía.....	115
5. <i>Análisis de imagen</i> .....	116
6. <i>Procedimientos experimentales</i> .....	116
6.1. Estudio curso temporal de los efectos de la administración aguda de etanol en ratas Wistar.....	116
6.2. Estudio de los efectos neuroquímicos del consumo crónico y forzado de etanol en ratas Wistar.....	118
6.3. Efecto de la conducta preferente de consumo en las alteraciones neuroquímicas causadas por el consumo crónico voluntario de etanol en ratas Wistar .....	120
6.4. Estudio de los marcadores neuroquímicos implicados en la vulnerabilidad por el consumo de etanol. Estudio comparativo entre ratas Wistar y Fawn-Hooded.....	122
6.5. Estudio curso temporal de las alteraciones neuroadaptativas inducidas por la abstinencia voluntaria a etanol en ratas Fawn-Hooded .....	124
6.6. Evaluación de la naltrexona en el consumo crónico preferente de etanol en ratas Wistar.....	126
7. <i>Métodos estadísticos</i> .....	128

<b>Resultados</b>	129
1. <i>Curso temporal de los efectos de la administración aguda de etanol en ratas Wistar. Alteraciones en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa</i>	129
2. <i>Estudio de los efectos neuroquímicos del consumo crónico y forzado de etanol en ratas Wistar</i>	140
2.1. <i>Patrón de consumo</i>	140
2.2. <i>Efectos del consumo forzado de etanol sobre la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa</i>	140
2.3. <i>Efectos del consumo de etanol forzado sobre la funcionalidad del receptor <math>\mu</math> opioide</i>	142
3. <i>Efectos del consumo crónico y voluntario de etanol sobre la actividad del sistema opioide endógeno y dopaminérgico en ratas Wistar. Diferencias en la expresión génica de los péptidos opioides y la tirosina hidroxilasa y alteraciones en la funcionalidad del receptor <math>\mu</math> opioide</i>	152
3.1. <i>Patrón de consumo</i>	152
3.2. <i>Efecto sobre la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa de conducta preferente para el consumo de etanol en ratas Wistar</i>	153
3.3. <i>Efecto del patrón de consumo de etanol sobre la funcionalidad del receptor <math>\mu</math> opioide</i>	155
4. <i>Marcadores neuroquímicos implicados en la vulnerabilidad por el consumo de etanol. Estudio comparativo entre ratas Wistar y Fawn-Hooded</i>	167
4.1. <i>Diferencias conductuales en la preferencia de consumo de etanol entre ratas Wistar y Fawn-Hooded</i>	167
4.2. <i>Diferencias basales en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa entre ratas Wistar y Fawn-Hooded</i>	168
4.3. <i>Diferencias basales en la funcionalidad del receptor <math>\mu</math> opioide entre las ratas Wistar y Fawn-Hooded</i>	168



<b>5. Estudio curso temporal de las alteraciones neuroadaptativas inducidas por la abstinencia voluntaria a etanol en ratas Fawn-Hooded .....</b>	<b>173</b>
5.1. Patrón de consumo .....	173
5.2. Alteraciones en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa durante la abstinencia de etanol .....	173
5.3. Efectos del consumo crónico y voluntario de etanol sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ durante el período de abstinencia .....	176
<b>6. Reducción del consumo crónico de etanol en animales preferentes inducido por la administración de naltrexona en ratas Wistar. Estudios sobre la funcionalidad de los receptores <math>\mu</math> opioides y de la expresión génica de los péptidos opioides, tirosina hidroxilasa, transportador de serotonina, factor liberador de corticotropina y receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>.....</b>	<b>185</b>
6.1. Patrón de consumo .....	185
6.2. Estudios del tratamiento con naltrexona del consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de los péptidos opioides, tirosina hidroxilasa, transportador de serotonina, factor liberador de corticotropina y receptor cannabinoide .....	186
6.3. Efecto del tratamiento de consumo crónico de etanol con naltrexona sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide .....	190
<b>Discusión .....</b>	<b>206</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>225</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>228</b>

## *Alcohol e Historia*

El etanol y sus propiedades se conocen desde antiguo, habiéndose utilizado por diferentes culturas, inicialmente para ritos religiosos y posteriormente como integrante de los hábitos de alimentación y de ocio.

Se piensa que la "vitis vinifera", vid capaz de producir vino para el consumo humano, es originaria de la región del caucaso meridional y el cultivo de la vid para la elaboración de vinos se atribuye a los habitantes de la región de Armenia, alrededor del 6.000 a.C.

Las primeras suposiciones sobre la existencia de alcohol las podemos cifrar en el quinto milenio a.C. a través de las pinturas rupestres encontradas en la Cueva de la Araña en Valencia donde se ve a unas mujeres recogiendo miel y almacenándola. Es posible que esta

miel fermentase y tras ser probada, gustasen los efectos que les produjo o que el propio fenómeno resultase mágico. Probablemente a esta espesa miel fermentada se le añadió agua para que resultara más agradable al paladar dando lugar a la "aguamiel" del que con mucha probabilidad se puede decir que fue el primer alcohol. Es de suponer que las propiedades psicotrópicas de la "aguamiel" influyeran en la sustitución de la sangre en los ritos sagrados. De hecho, desde el comienzo el alcohol fue sacralizado y destinado siempre a una utilidad religiosa debido al misterio que para aquella gente suponía el hecho de la fermentación.

Cuatro mil años antes de Jesucristo, en un texto egipcio encontrado en la pirámide de Sakkara se cita la cerveza, que se tomaba con cañas debido a que no se filtraba y contenía granos de la fermentación flotando en su superficie. Se le añadía jarabe de dátiles para reforzarla y de casia para su conservación. Los egipcios tomaban la cerveza en todas las ocasiones, tanto que se le consideraba la bebida nacional, junto con las aguas del Nilo, incluso estaba estipulado el consumo para los escolares. La ración diaria era de "tres panes de trigo y dos jarras de cerveza", que la madre tenía que llevar al niño a la escuela. La cerveza también se utilizaba la bebida en ritos sagrados de tipo orgiástico, para hacer peticiones a los dioses. En el Antiguo Egipto también era conocido el vino y lo cultivaban siendo muy apreciado por otros países, en especial el vino de palma. Era utilizado casi exclusivamente por las clases sociales acomodadas, la corte y en los cultos sagrados aunque El pueblo lo bebía en las grandes fiestas anuales.

Los judíos conocían también el vino al que atribuían propiedades medicinales. No obstante había sectas como los Nazaritas que preconizaban la abstinencia, posiblemente porque estaban en contra de la transformación de la agricultura nómada a la sedentaria, más que por la idea de sus efectos nocivos. El Antiguo Testamento hace frecuentes referencias al vino. Una de las más representativas está recogida en el Génesis, donde Noé, a quién se considera el inventor de la vinicultura, bebió hasta emborracharse, quedando desnudo y viéndole sus hijos. El otro es el de Lot, al que sus hijas, tras la destrucción de

Sodoma y Gomorra, y creyéndose solas en la tierra, se emborracharon para acostarse con él y así poder tener descendencia.

Tres mil años a.C. primero los Griegos y después los Romanos, conocieron el cultivo y recolección de la vid, así como su transformación en vino. Los griegos en "*La Ilíada*" (Héctor ruega a su madre que no le dé para beber vino, porque le enerva y le hace perder valor y fuerza) y en "*La Odisea*" de Homero, (el gigante Polifemo emborrachado por Ulises), refirieron los efectos del vino. Durante las fiestas en honor de Dionisios, los participantes, por lo general mujeres, danzaban y bebían hasta caer en un éxtasis que culminaba con el despedazamiento de un animal vivo, que se comían crudo. Los griegos solían beber el vino diluido con agua, normalmente cinco partes de agua por dos de vino por lo embriagante y espeso que éste era. El vino también era consumido en reuniones sociales o reunión de bebedores. En un primer momento se dedicaban al placer de la comida, y con posterioridad bebían vino, cerveza e hidromiel y fomentaban las relaciones sociales, como hablar de filosofía, de política, oír música o poesía.

En cuanto a los Romanos, fueron los difusores de la vid por todo el mundo y además los primeros en promulgar leyes sobre su cultivo y comercio. En Roma se bebía fundamentalmente en los banquetes, de forma especial la nobleza. Las clases sociales bajas tenían las tabernas llamadas "*thermopolia*" en las que se bebía e incluso se podía comer. También se bebía en las "*collegia*" que eran asociaciones que reunían a los miembros de una misma profesión. Virgilio en su libro, "*Georgicas*" hablaba de un concurso que se celebraba entre campesinos que se llamaba "*odre engrasado*" y que consistía en mantenerse el mayor tiempo posible, sin caerse, sobre un odre untado de grasa y lleno de vino. El que más tiempo se mantenía se llevaba como premio el odre. En Roma se celebraban dos fiestas, en las que era imprescindible el uso del vino, la Bacanalia en honor de Baco (dios del vino) y la Saturnalia en honor de Saturno. Estaban reguladas por el senado debido a los graves abusos que se producían. En las bacanales, al principio sólo participaban mujeres, pero los desórdenes públicos que se producían eran tan importantes, que tras un proceso en el que fueron ejecutadas miles de personas, tuvieron que ser prohibidas. En la Saturnalia

participaban los esclavos, que aquel día podían beber y que además tomaban el papel de amos, siendo servidos por estos. Aunque el vino se bebía en los banquetes de las clases elevadas, también lo podían tomar las clases populares en las tabernas que existían al efecto, al igual que sucedía en la cultura griega. En la *"Vida de los Doce Césares"* escrito por Suetonio se habla del cesar Tiberius Claudius Nero y se dice que sus compañeros de milicia le llamaban "Biberius Caldius Nero", (Bebedor de caldo negro), por su gran afición al vino tinto. Los romanos llevaron el vino en sus conquistas y lo fueron extendiendo por todos los territorios conquistados, estableciendo un importante comercio en torno al vino por toda Europa. Los celtas, habitantes de las Galias, comenzaron cultivando esas "vitjes", superando en extensión y calidad a los romanos, además inventaron el tonel. La calidad de estos vinos superó tan ampliamente la de los vinos romanos, que el emperador Domiciano para proteger a los comerciantes de vino romanos, de los comerciantes galos, prohibió plantar más viñedos en aquel territorio y ordenó destruir la mitad de los que había ([Sournia, 1990](#)).

El patrón de uso en Oriente fue radicalmente distinto del de Occidente. La práctica de hervir el agua para el té que creó un suministro seguro de bebidas y las dificultades genéticas de gran parte de la población para metabolizar el alcohol, ayuda a entender la diferente utilización. Por el contrario, occidente afrontó dichos problemas utilizando el vino y la cerveza. No debe olvidarse que hasta el siglo XIX no se posibilitó el conocimiento de la participación de los microorganismos en las enfermedades y la utilización de medidas para combatirlos. Esto hizo que durante siglos, los occidentales recurrieran al alcohol, no solo por los efectos psicotrópicos, sino como medida para evitar las enfermedades asociadas a la contaminación de las aguas.

Son los Árabes sobre el año 800 d. C. quienes descubrieron la destilación del vino y consiguieron bebidas de más alto contenido en etanol. No se sabe exactamente a quien atribuir la invención del alambique, aunque para algunos fueron los egipcios, pero sin los métodos de enfriamiento introducidos por los árabes. En España, es Ramón Llull (1233-1315) el primero que describe el proceso de la destilación del alcohol y creía que prolongaba la vida y lo llamo "agua de la vida".

En la Edad Media el vino estuvo controlado por la Iglesia. Tener viñedos era imprescindible para obtener el vino necesario para la celebración de la eucaristía y no verse obligados a comprarlo ni a importarlo. Las viñas, por otro lado, eran una fuente evidente de ingresos y por tanto de poder. También significaba, para los obispos, poder ofrecerlo a sus invitados en los banquetes y para los monasterios, poder ofrecerlo en su misión de hospedaje. Esto hizo que en la Edad Media los monasterios, particularmente en Francia, fueran los auténticos centros de comercio del vino. Tenían también el vino, porque el alcohol era considerado como una medicina saludable para el organismo y el lugar donde existían "farmacias" estables eran los monasterios. Además, allí fue donde se comenzaron a elaborar las bebidas espirituosas –los destilados– debido a sus conocimientos sobre la destilación. La mayor parte de los licores se deben a los monjes: el güisqui, el chartreuse, el kirsch. En el siglo XIV el alcohol era una sustancia importante, se usaba como disolvente en la preparación de perfumes, como medicamento, para usos religiosos y en el trueque por otros productos. La afición generalizada a los licores se relacionó con las epidemias del siglo XIV, en particular con la Peste Negra de 1347-1351. Aunque el alcohol no acabó con la peste, lograba que la víctima estuviera más tranquila. De ahí que los médicos los utilizaran como analgésicos y euforizantes. Hay que recordar que la palabra alcohol sólo comenzó a utilizarse en el siglo XVI, ya que hasta entonces se le llamaba "*acqua vitae*". El alcohol –vinos y licores– también posibilitó que se pudieran hacer viajes transoceánicos como el de Colón, habida cuenta que el vino o la cerveza aguantaban mucho más que los barriles de agua.

En el siglo XVII comenzó la comercialización del vino. Se sabía que el vino natural no se podía trasladar debido a que durante su transporte se estropeaba. Se descubrió que la mezcla de varios vinos favorecía el transporte y los cambios de temperatura. Más tarde, cuando se le adicionaron diferentes sustancias, también pudo transportarse sin que se alterase. No obstante, la introducción de los destilados propició el inicio de la comercialización del alcohol, alcanzando un gran desarrollo durante los siglos XVIII y XIX.

Durante el siglo XIX, Pasteur descubrió que los microorganismos eran los responsables de la fermentación, posibilitando la mejora de los vinos. También se produjo un importante incremento en el consumo de alcohol por el auge de las comunicaciones y por la revolución industrial. La comercialización del alcohol se consiguió por el perfeccionamiento en el transporte del vino y en su capacidad de conservación. Sin olvidar que la mejora de la distribución posibilitó que se encontrara en cualquier lugar. La revolución industrial favoreció la emigración de los núcleos rurales a las grandes urbes, dando lugar a la formación de suburbios pobres, masificados, con paro y malas condiciones de vida, que favorecieron el consumo del alcohol. Los holandeses fueron los comerciantes más importantes en ese siglo debido a que perfeccionaron las técnicas de producción, conservación y transporte del alcohol. Además, fueron los inventores de la ginebra, bebida que tuvo muy pronto una amplia aceptación y difusión, especialmente en Gran Bretaña.

Recorriendo la historia del alcohol no debe pasarse por alto uno de los episodios más controvertidos en la historia del alcohol: "la ley seca", En 1918, entró en vigor en EE.UU. la prohibición constitucional del consumo y venta de bebidas alcohólicas con más de un 0.5% de alcohol. Dicha ley fue derogada en 1933 y sus efectos todavía son discutidos. Mientras que para unos se evitó que el país entero se alcoholizara, para otros fue perjudicial, porque fomentó el uso del alcohol. Las consecuencias más destacadas fueron que su consumo pasó a ser ilegal, algo emocionante, para algunos, que convertía al que lo hacía en un delincuente. La gente acudía a beber a lugares de mala reputación, incluso comenzaron a entrar en ellos las mujeres. Se generalizó el uso de la "*petaca*" para poder llevar el alcohol escondido a todas partes. Se consumía alcohol industrial y para disimular su mal sabor se inventó el "*cocktail*" una mezcla de alcohol con bebidas como el limón, naranja o coca-cola. Aumentaron las enfermedades producidas por los alcoholes que se vendían, así como las muertes, en partes debidas al metílico adulterante. Proliferaron las mafias organizadas y aumentó la delincuencia. Las arcas del estado dejaron de recaudar los impuestos del alcohol y millones de dólares pasaron a manos de estas bandas.

Durante el siglo XX se ha producido el fenómeno de la globalización de los patrones de uso. Hasta la primer mitad de este siglo, cada país tenía unos patrones de consumo propios. El área mediterránea se caracterizaba por la utilización de vino, preferentemente asociado a los hábitos de alimentación. Progresivamente estos patrones se han ido sustituyendo por la forma de beber de países anglosajones, donde las cervezas y los licores están desplazando al vino, el consumo de alcohol ha dejado de estar ligado a las comidas y se ha circunscrito a las actividades de ocio, de forma que se consumen grandes cantidades de alcohol en un breve periodo de tiempo.

España es considerado un país vitivinícola donde el comercio del vino representa un elemento importante del producto interior bruto y muchas de las tradiciones culturales giran en torno al vino. Esto ha contribuido a que históricamente se haya convivido con la problemática del alcoholismo y también ha condicionado la forma en que se han afrontado dichos problemas. En España se ha producido un proceso evolutivo socialmente condicionado, que partía de una situación relativamente estabilizada hasta los años 50, con una alcoholización colectiva caracterizada por una gran disponibilidad fundamentalmente de vino y con una integración de su uso en la vida comunitaria, a su vez estable y jerarquizada, de características fundamentalmente agraria y patriarcal. En aquella estructura social, el alcohol no era percibido como factor distorsionante, existiendo una falta de percepción y por tanto de respuesta colectiva para los problemas alcohólicos sanitarios y sociales ya existentes entonces.

Entre los años 50 y 60, se asiste en España a un aumento muy patente de las complicaciones sanitarias y sociales del alcohol, que se puede poner en relación con las transformaciones sociológicas a que dan lugar los intensos procesos de desarrollo económico de esas décadas, los cuales determinaron con sus exigencias adaptativas y con los nuevos valores un cambio en la función social y en los patrones de consumo del alcohol.

Durante las décadas de los 60 y los 70, continuó el aumento y el cambio en los patrones de consumo, consolidándose la creciente utilización del alcohol como droga de



ajuste. El cambio de patrones de bebida, con un aumento muy importante del consumo de las bebidas destiladas, que se añadió al tradicional de vino, fue fomentado por el consumo, a favor de la gran disponibilidad de alcohol existente.

También en la década de los 70, irrumpieron de forma importante los consumos de otras sustancias tóxicas fundamentalmente ilegales pero también legales, cuyo uso y abuso vino a imbricarse en forma y cantidad variable con el del alcohol. La repercusión social del uso de alguna de estas sustancias, sobre todo de la heroína, comenzó a determinar una alarma social, que ya desde 1975 movilizó actividades preventivas y asistenciales centradas en dicha droga, sin que dicha movilización de recursos se extendiera a los graves y prevalentes problemas derivados del uso y abuso del alcohol.

Durante los años 80, se conjugaron los problemas sociales derivados de la recesión económica así como los cambios políticos, ya actuantes desde los últimos 70, con la instauración de la Constitución democrática. La puesta en marcha de modelos de convivencia nuevos, así como de acercamientos administrativos y sanitarios más adecuados a la situación actual, tuvieron sus repercusiones positivas y a veces negativas tanto en los patrones de uso del alcohol y sus consecuencias, como en la forma de afrontar la problemática sanitaria social existente.

Datos de la Oficina Regional Europea, demuestran que en España entre 1960 y 1983, se había producido un aumento de consumo de alcohol "per capita" del 40,4 %. Según se recogía en un estudio del Ministerio de Sanidad (1994), sobre estilos de vida de la población, España, en 1992, continuaba siendo el tercer país del mundo consumidor de alcohol etílico "per capita". Según los datos de ["World Drinks Trends" \(1996\)](#), España figura como el 5º país consumidor de alcohol, con 10.2 litros "per capita" en 1995. [Gil, Robledo y Rubio \(1998\)](#) estiman que durante la década de los noventa el consumo en nuestro país se ha estabilizado entre los 9- 10 litros de etanol por habitante al año.

## ***Farmacología del Etanol***

### **1. Farmacocinética del etanol.**

El etanol es una molécula pequeña y poco polar, que atraviesa bien las membranas biológicas. El etanol se absorbe rápidamente, sobre todo a nivel intestinal, siendo metabolizado la mayor parte en el hígado.

Dentro de una gran variabilidad individual, los efectos de la bebida dependen de la concentración sanguínea y aunque el responsable principal del daño orgánico es el etanol, también existen otros productos químicos en las bebidas que pueden contribuir a incrementar este daño cuando se bebe en exceso como alcoholes de bajo peso

molecular (metanol, butanol), aldehídos, ésteres, histamina, fenoles, taninos, hierro, plomo y cobalto.

### ***1.1. Absorción.***

El etanol se absorbe en el estómago (20-25%), el intestino delgado y el colon sin sufrir transformaciones. Además, el etanol también puede absorberse a través de los pulmones (en forma de vapor) y vía subcutánea. En el estómago, la absorción es rápida pero luego disminuye hasta hacerse muy lenta aunque la concentración gástrica siga siendo elevada. El volumen, carácter y dilución de la bebida alcohólica, la presencia de alimentos, el tiempo que se tarda en ingerir la bebida (las cervezas son de las que más tardan en absorberse) y las peculiaridades personales son influencias importantes en la velocidad de vaciamiento gástrico. Como sólo una pequeña parte del etanol es absorbido en el estómago, los factores que retrasan el vaciado gástrico enlentecen la absorción. La presencia de agua incrementa la absorción mientras que la de grasas y la de proteínas la disminuyen.

La absorción del intestino delgado es muy rápida y completa, independiente en gran parte de la presencia de alimentos en el estómago o el intestino. Algunos hidratos de carbono aumentan la velocidad de absorción intestinal del etanol y la reducción del peristaltismo la disminuye.

Antes de los cinco minutos tras la ingestión puede ser detectada ya su presencia en la sangre. Aproximadamente un 90% del etanol se absorbe entre los 30 y los 60 minutos, alcanzando los picos máximos de concentración entre los 30 y los 90-180 minutos.

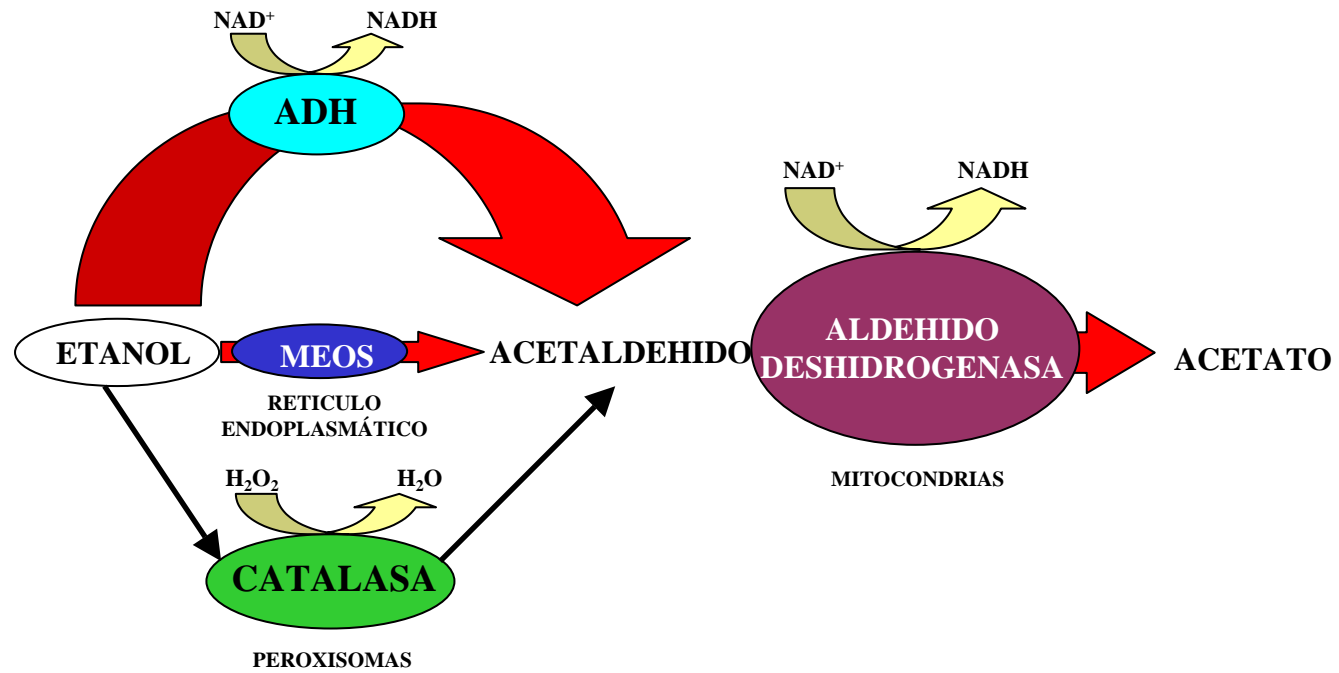
El tiempo de vaciamiento gástrico y por tanto el comienzo de la absorción intestinal muy rápida puede ser el factor principal que determina la gran variedad de velocidades de absorción del etanol ingerido que se ven en los diferentes individuos y en otras condiciones. (Muehlberg, 1958; Broitman y cols., 1976; Kalant, 1971; Fujiyama y cols., 1995)

### ***1.2. Distribución.***

Después de su absorción, el etanol se distribuye de un modo más o menos uniforme en todos los tejidos y líquidos del cuerpo con un volumen de distribución de 0.5 a 0.6 l/kg. La tasa de 0.5, sería propia de mujeres, ya que por lo general tienen más grasa y menos agua que los varones, mientras que en los niños se elevaría hasta 0,7 l/kg. El recorrido que sigue el etanol le lleva, una vez absorbido en el estómago e intestino delgado hasta el hígado vía portal, donde sufre efecto de primer paso, de donde se recoge por la vena porta y la suprahepática para llegar al corazón que termina enviándolo a toda la economía. Ya en los tejidos periféricos, el etanol penetra en éstos en función de sus contenidos hídricos. Debido a esta dinámica, durante la fase más rápida de la absorción, puede haber diferencia de concentraciones entre la sangre venosa y la arterial. Por esta razón, a veces, la concentración de etanol en el aire alveolar, puede ser superior a la de la sangre venosa. Cuando se llega a la igualdad en las concentraciones de etanol entre la sangre y los tejidos, estas diferencias desaparecen ([Holford, 1987](#); [Kalant, 1971](#); [Norberg y cols., 2003](#))

### ***1.3. Metabolismo y eliminación.***

El metabolismo del etanol es constante en el tiempo e independiente de su concentración en sangre (cinética de orden cero). En un adulto sano, la velocidad de metabolización, es de unos 120 mg/kg por hora y ésta se produce sobre todo en el hígado, gracias a la etanol-deshidrogenasa, enzima tipo metaloproteína que contiene zinc de peso molecular de unos 80.000 y utiliza el NAD como receptor de H<sup>+</sup>. El metabolito resultante es el acetaldehído, que pasa a acetil CoA, posteriormente oxidado en el ciclo del ácido cítrico o se utiliza en las diversas reacciones anabólicas que intervienen en la síntesis de colesterol, los ácidos grasos y otros constituyentes de los tejidos. La etanol-deshidrogenasa, no es una enzima específica, si no que puede oxidar también otros alcoholes alifáticos. Existen también otras rutas de metabolización del etanol, como el sistema de oxidación microsomal del etanol, localizado en el retículo endoplásmico liso del hígado y que puede llegar a hacerse cargo del 25% del metabolismo del etanol, sobre todo



**Figura I-1.** Metabolismo del etanol. ADH, alcohol deshidrogenasa; MEOS, sistema de oxidación microsomal de etanol.

en caso de ingestas abundantes y el sistema catalasa-peroxidasa, que está presente especialmente en los microsomas hepáticos, pero tiene menor importancia cuantitativa. Alrededor de un 2% (que se puede elevar hasta el 10% en grandes ingestas), escapa a la oxidación, eliminándose entonces esta fracción a través de la orina y el aire espirado aunque pueden también detectarse pequeñas cantidades de etanol en el sudor, las lágrimas, la bilis, el jugo gástrico, la saliva y otras secreciones ([Rubin y Lieber, 1968](#); [Wartburg, 1971](#); [Lieberg y cols., 1975](#); [Teschke y cols., 1977](#); [Pirola, 1978](#); [Ueno y cols., 1990](#)).

## **2. Farmacodinamia del etanol.**

Tradicionalmente, se venía considerando que el etanol ejercía sus efectos depresores en el sistema nervioso central al disolverse en las membranas lipídicas y por lo tanto, modificando la funcionalidad de los canales iónicos y de otros sistemas de proteínas situadas a este nivel. Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos estudios centrados en el conocimiento íntimo de los efectos del etanol, tanto en relación con su administración aguda como crónica sobre diversos sistemas bioquímicos de receptores y neurotransmisores.

El etanol es fundamentalmente un depresor de la transmisión nerviosa en el sistema nervioso central aunque también posee efectos estimulantes que dependen de la concentración sanguínea de la droga, de modo que estos efectos estimulantes que aparecen con el consumo de dosis bajas de etanol responden a una acción farmacológica de desinhibición cortical ([Pohorecky y Brick, 1988](#)). Conforme aumentan los niveles de etanol en sangre, se incrementa la depresión central, debido a que el efecto inhibitor va a ir afectando a otros centros nerviosos. Se cree que los principales sistemas de neurotransmisores implicados en los efectos agudos del etanol son el sistema gabérgico y el glutamatérgico ([Alguacil, 1996](#); [Camí y Ayesta, 1997](#)). El GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante del sistema nervioso central y está implicado en la mediación

de la inhibición pre y postsináptica de la actividad neuronal (Curtis, 1995; McKernan y Whiting, 1996; Krnjevic, 1997; Avoli y cols., 1997; Gottlieb, 1988). En este sentido, parece que los efectos iniciales estimulantes del etanol pueden deberse a la inhibición de la actividad gabérgica, mientras que los efectos sedantes subsiguientes al consumo de dosis altas pueden ser mediados por la activación de este sistema inhibitorio (Reynolds y cols., 1992; Proctor y cols., 1992a, b).

Numerosos estudios han demostrado que el etanol agudo aumenta tanto las respuestas electrofisiológicas del GABA in vivo e in vitro como la activación del receptor GABA<sub>A</sub> (Reynolds y cols., 1992; Proctor y cols., 1992b; Freund y cols., 1993; Criswell y cols., 1993). En el receptor GABA<sub>A</sub>, el etanol favorece el flujo de Cl<sup>-</sup> inducido por GABA, lo que ocasiona un estímulo de la hiperpolarización neuronal (Soldo y cols., 1994; Nishio y Narahashi, 1990; Rodgers-Neame y cols., 1995). El etanol provoca un incremento relativamente selectivo en los efectos del GABA en la capa CA3 hipocampal, el colículo inferior, la sustancia nigra y el septo medio que se opone a la capa CA1 hipocampal o el septo lateral (Carlen y cols., 1990; Criswell y cols., 1995; Proctor y Dunwiddie, 1995). Una evidencia farmacológica indirecta, que muestra la estrecha relación existente entre el etanol y el receptor GABA<sub>A</sub> es el hecho de que la administración de agonistas y/o antagonistas del mismo, modifican los efectos del consumo de etanol (Carvalho y cols., 1986; Suzdak y cols., 1986; Palmer y cols., 1988; Mehta y Ticku, 1989). Sin embargo, no todos los receptores GABA son sensibles al etanol, debido a la heterogeneidad de las subunidades que componen este receptor (Criswell y cols., 1993; Valenzuela y cols., 1995; Harris y cols., 1995b) y a sus diferentes regulaciones sobre los genes (Li y cols., 1993; Beattie y Siegel y cols., 1993; Harris y cols., 1997) lo que desempeñaría un papel importante en la mediación de la respuesta aguda al etanol (Harris y cols., 1995a).

También existen interrelaciones entre el etanol y el receptor GABA<sub>B</sub> en distintos lugares del sistema nervioso central (Frye y cols., 1983, 1991; Palmer y Hoffer, 1990; Allan y Harris, 1989; Humeniuk y cols., 1993). A pesar de las evidencias iniciales de la implicación del receptor GABA<sub>B</sub> en los efectos del etanol en el cerebelo y la capa CA1 hipocampal,

estudios llevados a cabo con agonistas y antagonistas del receptor GABA<sub>β</sub> han descartado el papel principal de este receptor en las acciones del etanol (Frye y cols., 1991; Palmer y Hoffer, 1990; Frye y Fincher, 1996).

La administración de etanol también provoca cambios en la electrofisiología y en los efectos comportamentales de la neurotransmisión glutamatérgica. Estas alteraciones podrían contribuir a los efectos depresivos agudos y estimulantes del etanol. El etanol disminuye los efectos mediados por el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) y la duración de la apertura del canal de calcio voltaje-dependiente en el hipocampo, núcleo caudado-putamen, el locus coeruleus (Gonzales y Hoffman, 1991). El receptor NMDA contiene distintos sitios de unión para el glutamato, la glicina y otros compuestos que modulan la actividad del glutamato. De todos estos sitios, el etanol parece actuar sobre el receptor de la glicina, de manera que, la inhibición ejercida por la administración aguda de etanol origina una disminución del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través del canal que puede ser antagonizada por dosis elevadas de glicina (Blum y cols., 1974; Rabe y Tabakoff, 1990).

Aunque no se conocen totalmente las bases fisiopatológicas y bioquímicas de la dependencia alcohólica, de la necesidad imperiosa de beber y de las recaídas, se han postulado varias hipótesis al respecto. Entre ellas, cabe mencionar la implicación de los sistemas gabérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, el sistema opioide endógeno y el sistema glutamatérgico (Tsai y Coyle, 1998).

En cuanto a los efectos del etanol el sistema central de neurotransmisión serotoninérgico (5-HT), parece que en los alcohólicos este sistema se encuentra hipofuncionante. Este déficit, por un mecanismo compensador, provocaría una necesidad de consumir más etanol para restablecer los niveles sinápticos de serotonina. De hecho, se han observado niveles bajos de metabolitos de la serotonina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes alcohólicos y la relación inversa entre la concentración del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIIA) y el tiempo transcurrido desde la última ingesta de etanol (Heinz y cols., 2002; Roy y cols., 1991; Beck y cols., 1980; Ballenger y cols., 1979; Major y



cols., 1977). Una disfunción de la neurotransmisión serotoninérgica, asociada a pérdidas en el control de los impulsos, y que también se produce en otros trastornos psiquiátricos, como los trastornos depresivos y de ansiedad podría predisponer al consumo de etanol y a las recaídas alcohólicas (Thase y cols., 2001; Petrakis y cols., 2001; Heinz y cols., 1998; Janiri y cols., 1996; Naranjo y Kadlec, 1991). En este sentido, tanto en el ámbito experimental como en humanos, el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, como zimelidina y fluoxetina, que reducen sustancialmente, el consumo de etanol (Balldín y cols., 1994; Naranjo y cols., 1984, 1990, 1994; Cornelius y cols., 1997, 2000, 2001; Gorelick y Paredes, 1992; Kranzler y cols., 1995).

Desde la perspectiva experimental, se ha observado que animales consumidores crónicos de etanol muestran un incremento de la densidad de terminaciones gabérgicas en el núcleo accumbens. En este sentido, algunos autores han sugerido, que las prolongaciones gabérgicas que parten del núcleo accumbens hacia el núcleo pálido ventral y la sustancia innominada constituirían una vía común en los efectos reforzadores de las drogas de abuso.

La introducción en clínica de nuevos fármacos como la naltrexona, ha reavivado la relación existente entre la adicción a etanol y el sistema opioide endógeno. Numerosos estudios experimentales en animales y ensayos clínicos, han puesto de manifiesto que la ingesta aguda de etanol estimula los receptores opioides. Por otro lado, se ha hipotetizado que una disfunción de los receptores opioides podría formar parte de las bases biológicas del deseo de bebida y de las recaídas que se observan tras la exposición crónica al etanol. El sistema opioide endógeno puede desempeñar también un importante papel en la mediación de las diferencias genéticas observadas en la conducta de ingesta alcohólica. Comentaremos el papel del sistema opioide endógeno más profundamente en secciones posteriores de esta Tesis.

La administración crónica de etanol ocasiona una disfunción de la transmisión glutamatérgica y de la función del receptor NMDA, que da lugar a un aumento de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y a un incremento de la expresión de los receptores NMDA,

lo que puede contribuir a explicar la hiperexcitabilidad que sufren los pacientes alcohólicos abstinentes (Whittington y cols., 1995). De hecho, parte de la sintomatología de este síndrome de abstinencia podría ser controlada con fármacos antagonistas de los canales del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se cree que estas alteraciones de la transmisión glutamatérgica podrían estar relacionadas con el deseo compulsivo de consumo de etanol y las recaídas alcohólicas (Heinz y cols., 2003; Soyka y Preuss, 2003; Backstrom y cols., 2004).

Pero las acciones bioquímicas del etanol no están limitadas a su interacción con receptores proteínicos sino que también ocasionan modificaciones en estructuras intracelulares, responsables de los cambios adaptativos observados a largo plazo. Cabe mencionar, el efecto del etanol sobre las proteínas de membrana que modulan la formación de segundos mensajeros intracelulares. A estos mensajeros intracelulares pertenecen las proteínas G que están unidas a las membranas, segundos mensajeros como el AMP cíclico o como el calcio intracelular y proteínas fosforilizadoras que, añadiendo o quitando grupos fosfatos de todos los tipos de proteínas neuronales, alteran su función y son las responsables del amplio espectro de respuestas biológicas que se producen en la neurona, incluyendo las modificaciones en la expresión génica de las mismas. Así, se sabe que el etanol reduce la actividad del sistema de las fosfolipasas, sin que existan datos concluyentes sobre su efecto sobre el sistema de la adenilatociclasa.

El punto final de estas cascadas bioquímicas son los factores de transcripción, que se unen de forma específica a secuencias de ADN localizadas en las regiones promotoras de los genes y que aumentan o disminuyen la tasa de transcripción de dichos genes. Los factores de transcripción más conocidos son el CREB, el fos y proteínas relacionadas. En esta línea, se ha comprobado que el etanol puede provocar alteraciones en la función de los factores de transcripción (He y cols., 2002, 2004; You y cols., 2002; Kapoun y cols., 1990; Katsuki y cols., 1996). Esta regulación de los factores de transcripción puede alterar la expresión de proteínas diana específicas que serían responsables de los cambios adaptativos de la función celular que conducen a la adicción.

Los cambios en la expresión de algunos genes podrían explicar algunos de los eventos bioquímicos observados en casos de consumo crónico de etanol como la reducción del efecto del etanol sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, posiblemente debida a una disminución de la transcripción genética de algunas subunidades de este receptor o los cambios en la densidad de receptores NMDA en distintas partes del cerebro, en animales de alto y continuado consumo de etanol.

### **3. Acciones farmacológicas del etanol.**

#### ***3.1. Sistema nervioso central.***

Como hemos comentado previamente, el etanol es, fundamentalmente, un depresor de la transmisión nerviosa en el sistema nervioso central, presentando tolerancia cruzada con otros agentes depresores del sistema nervioso central. Dentro de una gran variabilidad individual, los efectos centrales del etanol son proporcionales a su concentración sanguínea. El efecto inicial de la acción del etanol a este nivel se observa a partir de concentraciones tan bajas como 20 a 30 mg/dl y se manifiesta en forma de aparente estimulación, como consecuencia de la depresión de los mecanismos inhibidores de control nervioso. Así, tiene lugar un cuadro de pseudoexcitación, con sensación de euforia y optimismo y aumento de la sociabilidad; la conducta aparece más espontánea y menos autocontrolada pero disminuye la habilidad psicomotora más fina, aumenta el tiempo de reacción y se pierde capacidad de concentración e intuición. Conforme aumenta la alcoholemia (a partir de 100-150 mg/dl), se generaliza la depresión central y se vuelve más manifiesta, tanto a nivel psicológico como psicomotor; apareciendo torpeza expresiva y motora (disartria y ataxia), con pérdida de reflejos, sopor y sueño. Concentraciones más elevadas (entre 400 y 500 mg/dl) producen coma, depresión bulbar e incluso la muerte ([Pohorecky y Brick, 1988](#)).

Tras el consumo crónico de etanol, muchos de los mecanismos bioquímicos implicados en sus acciones agudas se ven alterados y el organismo establece una serie de fenómenos de adaptación, como la tolerancia y la dependencia. La proporcionalidad entre concentraciones y efectos se ve alterada por el desarrollo de tolerancia, de manera que los efectos motores, sedantes, ansiolíticos o anestésicos del etanol disminuyen de intensidad tras el consumo crónico de etanol. Aunque existe un componente farmacocinético en la tolerancia al etanol, por inducción del sistema enzimático oxidativo del etanol (MEOS), la tolerancia al mismo se debe principalmente a mecanismos de adaptación de tipo farmacodinámico.

La ingesta crónica excesiva de etanol se relaciona con trastornos neurológicos y mentales graves. Las deficiencias nutricionales y vitamínicas (tiamina) debidas a malnutrición, junto con las deficiencias en la función gastrointestinal y hepática que presenta el individuo alcohólico, son las responsables de la aparición de los síndromes de Wernicke y Korsakoff y de las polineuropatías periféricas. En los alcohólicos crónicos también se observan otras formas de demencia no carenciales, cuadros degenerativos cerebelosos y además, presentan un riesgo mayor de sufrir convulsiones ([Lieber, 1994](#)).

La administración aguda y crónica del etanol produce diversos efectos sobre el sueño. En personas no alcohólicas, el consumo agudo de etanol reduce la latencia inicial para el sueño y el sueño REM al principio de la noche, a veces con posteriores rebotes de sueño REM asociados con pesadillas, mientras que en los alcohólicos crónicos se produce una fragmentación notable del sueño, con frecuentes despertares ([Roehrs y cols., 2003](#); [Cohn y cols., 2003](#); [Roehrs y Roth, 2001](#); [Brower, 2001](#); [Gann y cols., 1998](#); [Lands, 1999](#); [Imatoh y cols., 1986](#); [Cernovsky, 1985](#)). En los pacientes con apnea obstructiva del sueño, la ingestión de etanol antes de dormir aumenta la frecuencia y la gravedad de las crisis apneicas y la hipoxia concurrente ([Aldrich y cols., 1993, 1999](#); [Cragg y Phillips, 1984](#)).

### ***3.2. Aparato digestivo.***

La ingestión de etanol ocasiona un aumento en la secreción de ácido y de gastrina, que puede causar esofagitis, probablemente secundaria al reflujo del contenido gástrico y gastritis con erosiones múltiples, que pueden llegar a sangrar ([Stermer, 2002](#); [Teyssen y Singer, 2003](#); [Chari y cols., 1993](#)).

Debido a que la mayor parte del etanol se absorbe en la porción proximal del intestino delgado, puede interferir con la absorción de vitamina B y otros nutrientes. En casos de intoxicación aguda puede dar lugar a diarrea, por aumento de la motilidad del intestino delgado y disminución de la absorción de agua y electrolitos aunque a dosis altas el etanol inhibe el peristaltismo intestinal ([Fujii y cols., 2002](#); [Tierney y cols., 1998](#); [Palasciano y cols., 1995](#)).

La ingestión crónica de etanol produce una amplia gama de efectos dosis-dependientes en el hígado, desde una acumulación de depósitos grasos inicial hasta una hepatitis alcohólica y una cirrosis hepática. La oxidación del etanol incrementa el cociente  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , dando lugar a una inhibición de la gluconeogénesis, produciendo hipoglucemia y aumentando la producción de lactato, lo que contribuye al desarrollo de la acidosis metabólica que se observa ocasionalmente en los alcohólicos. Además, se produce una disminución de la oxidación de los ácidos grasos en el ciclo de Krebs, con un aumento de acumulación de las grasas en el hígado. Por otra parte, el etanol es también un factor causal en la pancreatitis aguda o crónica ([Teh y cols., 1998](#)).

### ***3.3. Aparato respiratorio.***

A dosis moderadas, el etanol, en el ser humano, puede estimular o deprimir la respiración; no obstante, en todos los casos se deprime la reacción ventilatoria al dióxido de carbono. Grandes cantidades de etanol producen depresión respiratoria peligrosa e incluso mortal ([Moss y Burnham, 2003](#)).

### **3.4. Aparato cardiovascular.**

El etanol, a dosis moderadas, disminuye la contractilidad miocárdica y causa vasodilatación periférica, dando lugar a un descenso leve de la presión arterial y a un aumento compensador de la frecuencia y gasto cardíaco (Sesso, 2001; Hemery y cols., 2000; Friedman, 1998). En grandes cantidades, origina un aumento dosis-dependiente de la presión arterial, que es reversible tras unas semanas de abstinencia. Se estima que el abuso de etanol es el responsable de un 20 a un 30% de todos los casos de hipertensión arterial (Beilin, 1995). En distintos estudios se ha constatado que el consumo regular de grandes cantidades de etanol es un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión y de accidente cerebrovascular (Lip y Beevers, 1995). Además, el consumo excesivo de etanol a largo plazo ejerce en gran medida efectos dañinos irreversibles en el corazón, y es una de las causas más importantes de miocardiopatía (Lee y Regan, 2002; Piano, 2002).

Por otro lado, en diversos estudios se ha observado una relación negativa entre la ingestión crónica de pequeñas dosis de etanol (10 g/día) y la incidencia de enfermedad coronaria (Imhof y Koenig, 2003). Este evento podría estar relacionado con el efecto antiagregante de dosis bajas de etanol aunque quizás sea debido en mayor medida a los efectos antioxidantes de los flavonoides y taninos de algunos tipos de vino tinto ya que este beneficio no se ha observado con otras bebidas alcohólicas (Wu y cols., 2001; Papadakis y cols., 2000).

### **3.5. Sistema hematopoyético.**

El etanol tiene diversos efectos hematológicos agudos y crónicos de carácter reversible en todas las células de la sangre (Scharf y AuL, 1988; Herbert y Tisman, 1975). Entre ellos se encuentran las anemias sideroblástica y megaloblástica, trombocitopenia, leucopenia y disminución de la movilidad de los leucocitos. Además, el etanol puede disminuir la agregación plaquetaria e inhibir la liberación de tromboxano A<sub>2</sub> (Sacanella y Estruch, 2003).

### ***3.6. Aparato urogenital.***

A dosis moderadas, el etanol aumenta la libido en el varón pero disminuye la potencia sexual. La ingestión crónica de etanol en el varón puede causar impotencia, atrofia testicular y ginecomastia, mientras que en la mujer puede producir amenorrea, disminución del tamaño de los ovarios, esterilidad y abortos espontáneos (Peugh y Belenko, 2001; Taniguchi y Kaneko, 1997; Becker, 1993; Crowe y George, 1989; Roman, 1988).

El etanol favorece la diuresis, concentración dependiente, debido a la inhibición de la secreción de hormona antidiurética que produce. No obstante, si se administra en dosis repetidas puede tener un efecto antidiurético (Rodrigo y cols., 1998; Ragland, 1990).

### ***3.7. Efectos teratógenos.***

El etanol parece ser la causa más frecuente, de deficiencia mental inducida de manera teratógena. La incidencia del síndrome alcohólico fetal varía entre 1:300 y 1:2000 recién nacidos vivos (uno por cada tres lactantes de madres alcohólicas). La ingestión de etanol está contraindicada durante el embarazo, incluso a dosis moderadas, ya que no se ha definido la cantidad de etanol relacionada con este síndrome, ni el momento específico del embarazo (Spagnolo, 1993; Brien y Smith, 1991; Hoyseth y Jones, 1989; Hill y cols., 1989).

## ***El Etanol y el Sistema Opioide Endógeno***

### **1. El sistema opioide endógeno.**

En 1973 tres grupos de investigadores ([Pert y Snyder, 1973](#); [Terenius, 1973](#); [Simon y cols., 1973](#)) demostraron que el organismo poseía receptores específicos que reconocían selectivamente moléculas con estructuras semejantes a la morfina y cuya activación producía analgesia, tolerancia, dependencia física, acciones en el sistema nervioso autónomo, cambios conductuales y otros muchas acciones debidas a la administración de opioides.

El descubrimiento de estos receptores sugería la existencia de sustancias endógenas que activasen esos receptores. [Hughes y cols \(1975\)](#) fueron los primeros en describir tales



sustancias endógenas que se identificaron más tarde como moléculas peptídicas de cinco aminoácidos y que fueron denominadas "encefalinas" por encontrarse en el cerebro.

A partir de ese momento, se descubrieron numerosos péptidos con actividad opiácea tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos. Estos péptidos opioides endógenos varían en tamaño, pero la mayoría comparte la misma secuencia amino terminal Thr-Gly-Gly-Phe-Met. Los avances en las técnicas de biología molecular demostraron que estos péptidos proceden de tres familias distintas de genes. Así, las encefalinas proceden de la proencefalina, la  $\beta$ -endorfina procede de la proopiomelanocortina y la dinorfina procede de prodinorfina.

La presencia o ausencia de cierta secuencia aminoacídica en el extremo carboxilo terminal de estas moléculas peptídicas puede influir significativamente en la potencia farmacológica, la duración de los efectos y la selectividad por los subtipos de receptor del péptido en concreto. Tras la progresiva fragmentación, los péptidos opioides endógenos experimentan un procesamiento adicional de glicosilación y acetilación, que también alteran sus propiedades biológicas.

No solo existen varios tipos de opioides endógenos biológicamente activos, sino que además, cada uno de ellos puede unirse a varios tipos de receptores opioides ([Iwamoto y Martin, 1981](#)). Se han descrito varios subtipos de receptores opioides. Así, los receptores  $\mu$ , se caracterizaron por su unión a la morfina, los  $\delta$  (la d es de vaso deferente de ratón) se unen preferentemente a encefalinas y los  $\lambda$  por su unión con el alcaloide sintético ketociclazocina.

### ***1.1.- Biosíntesis de los péptidos opioides.***

#### **1.1.1.- Beta-endorfina.**

$\beta$ -Endorfina (1-31) es el opioide endógeno de mayor tamaño, contiene 31 aminoácidos. Aunque fue descubierto después de las encefalinas ([Li y Chung, 1976](#)), su ruta biosintética fue caracterizada antes de que se identificara al precursor de las encefalinas.

[Eipper y Mains \(1980\)](#) fueron los primeros en demostrar que la  $\beta$ -endorfina compartía un precursor común con la hormona  $\beta$ -lipotropina, la corticotropina y la hormona estimulantes de los melanocito ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -MSH). Este gran precursor se denominó proopiomelanocortina, denominación que engloba el nombre de la mayoría de los péptidos que lo constituyen.

La proopiomelanocortina se sintetiza como una preprohormona en el retículo endoplásmico rugoso. Su secuencia peptídica contiene 239 aminoácidos y un péptido señal de 26 aminoácidos que le permite moverse a través de la membrana del retículo endoplásmico para ser transportado hacia el aparato de Golgi. La secuencia señal se elimina antes de que termine la síntesis de la cadena polipeptídica y así puede asumir su estructura secundaria durante su transporte hacia el aparato de Golgi. Una vez allí, la hormona experimenta un procesamiento proteolítico por la acción de enzimas del tipo de la tripsina o quimiotripsina o por enzimas que favorecen la glicosilación, la acetilación, la fosforilación o la metilación, generando los péptidos activos que proceden de la proopiomelanocortina. Por último, estas moléculas maduras se almacenan en vesículas que se fusionan con la membrana celular durante el proceso de liberación expulsando su contenido al espacio extracelular ([Akil y cols, 1984](#)).

El procesamiento postraducciona l de proopiomelanocortina es un mecanismo específico para cada tejido. La proopiomelanocortina se sintetiza predominantemente en la hipófisis y en el hipotálamo.

En el lóbulo anterior de la hipófisis, dentro de la secuencia madura de proopiomelanocortina hay 39 aminoácidos que codifican la hormona más importante de su procesamiento, la corticotropina. Además, el fragmento carboxi-terminal de proopiomelanocortina situado después de la secuencia de corticotropina, sintetiza  $\beta$ -lipotropina, que es a su vez escindida generando  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina.

En lóbulo intermedio, una porción de la molécula de corticotropina (1-13) actúa como  $\alpha$ -melanotropina. La  $\beta$ -lipotropina también es procesada en su extremo carboxilo terminal produciendo  $\alpha$ -melanotropina. Por último  $\alpha$ -melanotropina procede del extremo amino-terminal de la molécula de proopiomelanocortina (Eipper y Mains, 1980).

Por otro lado, en el núcleo arqueado del hipotálamo, el producto mayoritario del procesamiento de proopiomelanocortina es la  $\beta$ -endorfina (Emerson y Eipper, 1986; Gramsh y cols., 1980).

#### 1.1.2. Encefalinas.

Las encefalinas fueron los primeros opioides endógenos descubiertos. En 1975 Hughes y cols identificaron en el cerebro dos pentapéptidos con potente actividad opiácea, metionina y leucina encefalina (Thr-Gly-Gly-Phe- Met<sup>5</sup> ó -Leu<sup>5</sup>).

Debido a que la médula adrenal contenía altas concentraciones de encefalinas, fue en este tejido donde se caracterizó y se clonó su precursor en distintas especies; la proencefalina (Noda y cols., 1982). Aunque la proencefalina posee la misma secuencia aminoacídica que una parte de la  $\beta$ -endorfina, ésta no es su precursor biológico. Su biosíntesis sigue las mismas pautas biológicas que las expuestas previamente para proopiomelanocortina. Asimismo este polipéptido, también es susceptible de procesamiento diferencial dependiendo del tejido (Lindberg y Yang, 1984).

Tras caracterizar su estructura molecular, se aisló en el cerebro de rata un ADNc que codifica para encefalina utilizando una genoteca del núcleo caudado-putamen (Yoshikawa y

cols., 1984) demostrándose por primera vez que en el cerebro se expresaba el ARNm de proencefalina. Estudios posteriores han demostrado que la proencefalina se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso (Akil y cols., 1984). La secuencia codificante de la proencefalina se halla altamente conservada entre las distintas especies estudiadas (humana, murina y bovina).

### 1.1.3. Dinorfínas.

La familia de las dinorfínas fue la última familia de péptidos opioides en ser descubierta (Goldstein y cols., 1979). Su estructura se caracteriza por presentar una secuencia de aminoácidos básicos unida a la molécula de leucina-encefalina. Las dinorfínas comparten un precursor común denominado prodinorfina, que difiere tanto de proopiomelanocortina como de proencefalina. El gen de la prodinorfina ha sido clonado y se ha demostrado que su secuencia codificante está altamente conservada entre las distintas especies estudiadas (Kakidani y cols., 1982; Horikawa y cols., 1983; Jingami y cols., 1984; Civelli y cols., 1985). Su biosíntesis y procesamiento postraducciona l es similar al descrito para proopiomelanocortina y proencefalina. Tras su procesamiento proteolítico, la molécula de prodinorfina origina la  $\alpha$ -neoendorfina, dinorfina A (1-8) , dinorfina B (1-13) y dinorfina A (1-17), péptidos que demostraron ser muy potentes en varios ensayos biológicos, de ahí su nombre.

## ***1.2. Distribución de los ARNm de los péptidos opioides.***

### 1.2.1. Proopiomelanocortina.

La proopiomelanocortina se sintetiza fundamentalmente en el hipotálamo y en la hipófisis. En el cerebro, los cuerpos neuronales que contienen el ARNm de proopiomelanocortina se encuentran localizados en el núcleo arqueado del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario. Desde allí, proyectan largos axones  $\beta$ -endorfinérgicos tanto rostral como caudalmente a varias estructuras cerebrales. Un considerable número de terminales  $\beta$ -endorfinérgicos y encefalinérgicos confluyen; ambos tipos de neuronas

poseen terminales en la sustancia gris periacueductal, en la amígdala y en varios centros hipotalámicos y de la médula espinal. Esta compleja red de conexiones hacen del núcleo arqueado una región importante capaz de integrar sensaciones emotivas, funciones endocrinas e información sensorial, particularmente nociceptivas. En la hipófisis, la proopiomelanocortina se sintetiza en el lóbulo anterior e intermedio.

Como se ha mencionado anteriormente, el procesamiento postraducciona l de proopiomelanocortina es enormemente complejo. En el hipotálamo, la proopiomelanocortina origina mayoritariamente  $\beta$ -endorfina. Sin embargo, en la adenohipófisis, el principal producto del procesamiento de proopiomelanocortina es corticotropina, seguido de  $\beta$ -lipotropina,  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina, mientras que en el lóbulo intermedio los péptidos resultantes más relevantes son  $\beta$ -endorfina,  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  - melanotropina.

#### 1.2.2. Proencefalina.

La distribución del ARNm de proencefalina en el sistema nervioso central y en la médula espinal, ha sido descrita detalladamente por Harlan y cols ([Harlan y cols., 1987](#)). Las neuronas que contienen ARNm de proencefalina se encuentran ampliamente distribuidas dentro del sistema nervioso central. Así podemos encontrar una elevada densidad de ARNm de proencefalina en la corteza piriforme, neocortex, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y caudado putamen. Además, también abunda en el hipocampo, la amígdala, en el hipotálamo (mayoritariamente en el núcleo ventromedial, paraventricular y mamilar medial), y en la sustancia gris periacueductal.

La amplia distribución del ARNm de proencefalina , sugiere que este péptido pudiera estar implicado en numerosas funciones fisiológicas. Por ejemplo, las encefalinas podrían regular las respuestas de tipo emocional a través de áreas límbicas como la amígdala y el núcleo accumbens, así como la transmisión del impulso doloroso en la sustancia gris periacueductal. Las encefalinas también desempeñarían un importante papel sobre la

actividad locomotora a nivel del núcleo estriado. En el hipotálamo, las encefalinas regularían en parte la secreción de factores hipotalámicos de liberación hormonal.

En la médula espinal, se ha encontrado ARNm de proencefalina en el asta dorsal donde podría modular los impulsos nociceptivos del tracto paleoespinotalámico. Por último, también se expresa este mensajero en el sistema nervioso periférico y en la médula adrenal.

### 1.2.3. Prodinorfina.

Civelli y cols (1985) fueron los primeros en clonar, caracterizar y localizar el ARNm de la prodinorfina. Anteriormente, utilizando técnicas inmunocitoquímicas numerosos autores demostraron que los péptidos de prodinorfina están presentes en numerosas regiones cerebrales y en otros tejidos. Civelli y cols localizaron ARNm de la prodinorfina en elevadas concentraciones en el núcleo estriado, hipocampo, hipotálamo, cerebro medio, núcleo del tracto solitario, corteza, tálamo y cerebelo. También han encontrado una densidad moderada del ARNm de prodinorfina en la médula espinal, médula adrenal, testículos y en el lóbulo anterior de la hipófisis.

### ***1.3. Receptores opioides.***

Desde su descubrimiento en 1973, los receptores opioides han sido objeto de una intensa investigación que dio lugar a la aparición de tres tipos de receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  (James y Goldstein, 1984; Martin y cols., 1976; Gillan y Kosterlitz, 1982). Con el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos, resultó evidente que cada tipo de receptor opioide poseía propiedades farmacológicas específicas (Goldstein y Naidu, 1989), se encuentran diferencialmente distribuidos en el sistema nervioso central (Mansour y cols., 1988; McLean y cols., 1986) y que están implicados en una amplia variedad de comportamientos y funciones, entre las que se incluyen; la regulación de la nocicepción, del refuerzo y de la recompensa, la liberación de neurotransmisores, así como la modulación

neuroendocrina (Bozarth y Wise, 1984; Leadem y Yagenova, 1987; Pfeiffer y cols., 1985; Yaksh y Rudy, 1978; Schoffemeer y cols., 1988).

La reciente clonación de los receptores opioides (Evans y cols., 1992; Kieffer y cols., 1992; Meng y cols., 1993; Yasuda y cols., 1993; Chen y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Thompson y cols., 1993) ha permitido identificarlos como receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana. Los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  son homólogos uno con respecto al otro tanto en lo que se refiere al ácido nucleico como a la secuencia aminoacídica, estando altamente conservadas las regiones transmembrana y los bucles intracelulares. Las zonas más divergentes de estos receptores son los extremos amino y carboxilo terminal, la región transmembrana 4, y las extracelulares 2 y 3.

La transfección de estos clones en líneas celulares heterólogas sugiere que estos receptores se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa por la activación de proteínas G. Además, disminuyen la entrada de calcio en las neuronas bloqueando los canales de calcio de tipo N, y facilitando la apertura de canales de potasio (Tabla I-2). Por tanto, la activación de los receptores opioides conduce a una hiperpolarización de la membrana con la subsiguiente disminución del potencial de membrana neuronal que finalmente se traduce en una inhibición de la liberación de neurotransmisores (Mansour y cols., 1995).

La clonación de los receptores opioides ha permitido la visualización directa de las células los sintetizan utilizando la técnica de hibridación in situ y ha permitido comparar la distribución del ARNm con la de los sitios de unión receptorial detectados por autorradiografía (Mansour y cols., 1993, 1994a, 1994b, 1994c).

Cuando se comparan ambas distribuciones de los receptores opioides, existen regiones en las que hay una buena correlación, lo que sugiere una síntesis local del receptor. Sin embargo, en otras regiones existen discrepancias entre la distribución de la expresión

**Tabla I-1. Secuencia aminoacídica de los péptidos opioides endógenos.**

Precursor	Péptido	Estructura
<b>Proopiomelanocortina</b>	$\beta$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
<b>Proencefalina</b>	Leu-encefalina Met-encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
<b>Prodinorfina</b>	Dinorfina (1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln

**Tabla I-2. Resumen de la transducción de señales y farmacología de los receptores opioides.**

RECEPTOR OPIOIDE			
	m	d	k
<b>Familia génica</b>	Prot. G 7 DTM	Prot. G 7 DTM	Prot. G 7 DTM
<b>Organización génica</b>	Intrónica	Intrónica	Intrónica
<b>Tamaño del RNAm</b>	10-16 kb	4.5 Kb	5.2 Kb
<b>Nº de aminoácidos</b>	398	372	380
<b>Ligandos endógenos</b>	$\beta$ -endorfina Met-encefalina	Leu-encefalina	Dinorfina (1-17)
<b>Agonistas</b>	DAMGO Morfina	DPDPE	U-50488
<b>Antagonistas</b>	Naloxona	Naltrindol	Norbinaltrofimina
<b>Transducción de señal</b>	$\downarrow$ AMPc	$\downarrow$ AMPc	$\downarrow$ AMPc
<b>Sitios de glicosidación</b>	5	2	2



del ARNm y el sitio de unión al ligando en los que la anatomía sugiere el transporte del receptor hacia la terminal sináptica (Mansour y cols., 1995) (Tabla I-3).

## **2.- Interacción etanol-sistema opioide endógeno.**

Como ya hemos señalado anteriormente, el etanol afecta a numerosos sistemas de neurotransmisión como la potenciación de las respuestas gabérgicas y la inhibición de las respuestas glutamatérgicas (Nevo y Hamon, 1995). Sin embargo, el etanol también afecta al sistema opioide endógeno (Hamilton y cols., 1979; Volpicelli y cols., 1986) de dos formas distintas (Ulm y cols., 1995). La primera es que el etanol pudiera alterar la síntesis o liberación de péptidos opioides activando el mecanismo del refuerzo y la segunda es que el consumo de etanol modificaría la unión a los receptores opioides alterando de esta manera la señalización opioide. Tanto la alteración de la síntesis como la liberación de péptidos opioides o las variaciones intrínsecas en la neurotransmisión pueden alterar el consumo de etanol y modificar el desarrollo de la dependencia.

### ***2.1.- Interacción etanol-péptidos opioides endógenos.***

Numerosas evidencias sugieren que el etanol altera la actividad de los péptidos opioides endógenos en el cerebro y la hipófisis. Estas alteraciones podrían modular muchas de las respuestas neuroendocrinas y comportamentales del etanol incluyendo el refuerzo, y la dependencia (Figura I-2).

#### **2.1.1. Etanol y el sistema endorfinérgico.**

Aunque los tres sistemas de péptidos opioides están implicados en las acciones del etanol, la mayoría de investigadores se han centrado en los efectos del etanol y la  $\beta$ -endorfina en el cerebro y la hipófisis.

En los últimos años, distintos autores han estudiado los efectos agudos y crónicos del etanol sobre el sistema endorfinérgico centrándose en estudios de inmunoreactividad de la beta-endorfina y en la determinación de los niveles del péptido en el cerebro, la hipófisis y el suero en distintos modelos animales (Tabla I-4 y I-5)([Gianoulakis y Barcomb, 1987](#); [Anwer y Soliman, 1995](#); [Rasmussen y cols., 1998](#)).

Durante la administración aguda de etanol, la mayoría de resultados revelaron aumentos en la liberación de  $\beta$ -endorfina en la hipófisis, el hipotálamo y otras regiones cerebrales ([Rasmussen y cols., 1998](#); [Gianoulakis y Barcomb, 1987](#); [Thiagarajan y col., 1989](#)), exceptuando la corteza prefrontal ([Anwer y Soliman, 1995](#)), y de la expresión génica de proopiomelanocortina ([Rasmussen y cols., 1998](#); [Madeira y Paula-Barbosa, 1999](#)) aunque estos últimos datos no son del todo consistentes ([Kinoshita y cols., 2000](#)).

Las investigaciones de administración crónica de etanol sobre los niveles de expresión génica de proopiomelanocortina y de  $\beta$ -endorfina en el hipotálamo y la hipófisis no son consistentes debido a la utilización de distintos modelos animales (ratas Wistar frente razas preferentes seleccionadas), la metodología de la administración (inyecciones intra-peritoneales frente auto-administración oral) o la duración de los tratamientos (4 semanas frente 8 semanas). En este sentido cabe destacar que algunos estudios han demostrado aumentos en la expresión génica de proopiomelanocortina y  $\beta$ -endorfina sérica y cerebral ([Seizinger y cols., 1984a](#); [Gianoulakis y cols., 1988](#); [Wand, 1990](#); [Krishnan-Sarin y cols., 1998](#); [Schulz y cols., 1980](#); [Patel y Pohorecky, 1989](#)) mientras que otros han encontrado reducciones ([Seizinger y cols., 1984b](#); [Dave y cols., 1986](#)).

En ensayos clínicos en humanos (Tabla I-6), se ha observado que los niveles de  $\beta$ -endorfina sérica disminuyeron en alcohólicos con una ingesta mayor de 100 g/día durante 2 años ([Aguirre y cols., 1990](#)) y que en personas con una marcada historia familiar de alcoholismo, tanto los alcohólicos como los no alcohólicos con más de 6 meses de abstinencia, mostraron una disminución de niveles plasmáticos del péptido comparados con pacientes de riesgo bajo para el desarrollo del alcoholismo ([Gianoulakis y cols., 1989](#)). Esta

**Tabla I-3. Distribución de la expresión génica y densidad receptorial de los receptores opioides.**

RECEPTOR OPIOIDE			
	m	d	k
<b>Distribución receptorial</b>	Estriado		Área preóptica
	Tálamo		Eminencia media
	Hipocampo,	Neocórtex	Amígdala
	Sustancia gris periacueductal,	Estriado	Hipocampo
	Sustancia negra	Amígdala	Corteza
	Colículos		Médula espinal
	Núcleo del tracto solitario		
<b>Distribución del ARNm del receptor</b>	Tálamo		Hipotálamo
	Estriado	Corteza	Núcleo accumbens
	Locus coeruleus	Estriado	Sustancia nigra
	Núcleo del tracto solitario	Zona reticular lateral	Area ventral tegmental
			Núcleo del tracto solitario

**Tabla I-4. Diferencias innatas en los niveles de b-endorfina en regiones cerebrales de razas preferentes en comparación con razas no preferentes.**

Razas	Aumento	Disminución	Sin diferencias
<b>C57BL/6/DBA/2</b>	LI	Acb	LA, Amig, SG, C-Pu, CF, Hipoc, Septum
<b>AA/ANA</b>	LA, Hipoc, Septum	Amig, SG	LI, Acb, C-Pu, CF

Crabbe y cols., 1981;  
Gianoulakis y Gupta, 1986;  
de Waele y cols., 1992; de  
Waele y Gianoulakis, 1994

Gianoulakis y cols., 1992

circunstancia, sin embargo, no la encontramos utilizando modelos animales genéticos (Tabla I-6). Comparando ratones no preferentes DBA/2 y ratones preferentes C57BL/6 se pudo observar que estos últimos mantenían niveles séricos elevados de  $\beta$ -endorfina (Gianoulakis y Gubta, 1986a) y que entre ratas preferentes AA y no preferentes ANA no existen diferencias en los niveles séricos de  $\beta$ -endorfina (Gianoulakis y cols., 1992). A la vista de estos datos, es posible pensar que la  $\beta$ -endorfina hipofisaria (Gianoulakis y cols., 1989) no desempeñe un papel destacado en los efectos reforzantes del etanol.

Otros estudios en humanos (I-5 y I-6), han comprobado que en pacientes con una fuerte historia de alcoholismo familiar, la administración intra-gástrica de 0,5 g/kg de etanol causó un incremento importante en los niveles séricos de  $\beta$ -endorfina alcanzando incluso los niveles obtenidos en pacientes con bajo riesgo de desarrollar alcoholismo. Además, la ingesta de la misma cantidad de etanol en pacientes con escaso riesgo de desarrollo de alcoholismo fueron significativamente menores (Gianoulakis y cols., 1989). En una posterior replicación del estudio, se observó que los efectos sobre los niveles de  $\beta$ -endorfina tras la administración oral de etanol (0, 0.25, 0.5 y 0.75 g/kg) eran dosis dependientes en el grupo de riesgo alto mientras que prácticamente no existía efecto a cualquiera de las dosis utilizadas en el grupo de riesgo bajo (Gianoulakis y cols., 1996). Esta circunstancia es parecida a las encontradas en modelos animales de consumo de etanol (Tabla I-6). De hecho, utilizando un sistema de infusión, el etanol produjo una liberación de  $\beta$ -endorfina del hipotálamo en ratones preferentes C57BL/6 (de Waele y Gianoulakis, 1993) y ratas preferentes AA (de Waele y cols., 1994) que resultó muy superior a la liberación de  $\beta$ -endorfina en el hipotálamo de ratones no preferentes DBA/2 y ratas ANA respectivamente (Tabla I-6). También paralelamente, la expresión génica de proopiomelanocortina es mayor en ratones y ratas preferentes C57BL/6 y AA en el hipotálamo comparado con lo obtenido en ratones y ratas no preferentes DBA/2 y ANA (de Waele y cols., 1992; Gianoulakis y cols., 1992).

Dado que existe una proyección de neuronas que contienen  $\beta$ -endorfina desde el núcleo arqueado del hipotálamo al área ventral tegmental y al núcleo accumbens, el

**Tabla I-5. Efectos de la administración aguda y crónica de etanol sobre los niveles séricos y cerebrales de b-endorfina**

	Region	Agudo	Crónico		
<b>Humanos</b>	Suero Alcoholicos	↑	Gianoulakis y cols., 1989; Aguire y cols., 1995; Gianoulakis y cols., 1996		
	Suero No-Alcoholicos	- ↓	Gianoulakis y cols., 1989; Gianoulakis y cols., 1996; Aguire y cols., 1995		
<b>Modelos Animales</b>	Suero	↑	Gianoulakis y Gupta, 1986 Patel y Pohorecky, 1989	↑	Eskelson y cols., 1980; Patel y Pohorecky, 1989
	Hipofisis	↑	Patel y Pohorecky, 1989	↓	Schulz y cols., 1980; Patel y Pohorecky, 1989
	Corteza Frontal	-	Anwer y Soliman, 1995		
	Hipotálamo	↑	Patel y Pohorecky, 1989	↑	De Waele y Gianoulakis, 1994 Patel y Pohorecky, 1989
	Hipocampo Midbrain Septum	↑ ↑	Anwer y Soliman, 1995 Anwer y Soliman, 1995	↑	De Waele y Gianoulakis, 1994

**Tabla I-6. Características de la b-endorfina (y ARNm POMC) en alcohólicos frente a no alcohólicos y en razas animales preferentes frente a razas no preferentes.**

Grupo/Raza	Niveles Séricos	Liberación Hipotalámica Basal	ARNm POMC Hipotálamo	Liberación inducida por etanol (aguda)
<b>Alcoholicos/ No Alcoholicos</b>	↓			↑ (suero)
<b>C57BL/6 DBA/2</b>	↑	↑	↑	↑ (hipotálamo)
<b>AA/ANA</b>	-	↓	↑	↑ (hipotálamo)

contenido de  $\beta$ -endorfina hipotalámico basal podría tener alguna significación en los efectos reforzantes del etanol ([Gianoulakis y de Waele, 1994](#)) (Tabla I-6). Esto se apoya en el hecho de que los animales preferentes con menor nivel basal de  $\beta$ -endorfina en el hipotálamo presentan mayor consumo de etanol y por tanto mayor probabilidad de desarrollar dependencia ([Gianoulakis y Gupta, 1986a](#)).

#### 2.1.2.- Etanol y el sistema encefalinérgico.

Aunque la información disponible sobre la interacción entre el sistema encefalinérgico y el etanol es muy inferior a la disponible con el sistema endorfinérgico, algunas evidencias indican que también este sistema se encuentra afectado por el etanol aunque los efectos observados no son claros debido a la variabilidad experimental encontrada por la utilización de distintas especies de animales, líneas específicas y razas y metodologías variadas de administración de etanol.

En los experimentos de administración aguda de etanol comparando animales preferentes (P) y no preferentes (NP) se observó que la respuesta de la expresión génica de proencefalina variaba en función de la preferencia por el etanol y de las distintas regiones cerebrales analizadas sin que se hubieran encontrado previamente diferencias basales entre ambos grupos de animales ([Li y cols., 1998](#)). Así, se encontraron disminuciones de la expresión génica en el núcleo accumbens y la amígdala en ratas NP frente a los aumentos en el núcleo accumbens en ratas P. Estos últimos resultados coinciden por los presentados por [Gortari y cols. \(2000\)](#) en ratas Wistar, además de observar también incrementos en los niveles de ARNm de PENK en la corteza prefrontal. En otros estudios de medidas de niveles de encefalina (Tabla I-7), también se ha comprobado la existencia de diferencias en los resultados hallados por distintos autores en diversas regiones cerebrales como el hipocampo o el cerebro medio (Tabla I-8) ([Schulz y cols., 1980](#); [Seizinger y cols., 1983](#)).

En los estudios crónicos, la diversidad de resultados continua patente, de manera que se han obtenido resultados contradictorios tanto en la determinación de encefalina

**Tabla I-7. Diferencias innatas en los niveles Met y Leu-encefalina en regiones cerebrales de razas preferentes frente a razas no preferentes por el consumo de etanol.**

Raza	Incremento	Disminución	Sin diferencias	
<b>AA/ANA</b>		Hipof (Met y Leu) Acb (Met) VTA (Leu)	C-Pu, Hipotal., SN Acb (Leu) VTA (Met)	Nylander y cols., 1994
<b>C57BL/6 DBA/2</b>	Corteza Frontal	Cerebelo	C-Pu, Hipocam., Hipófisis, Hipotal., Médula	George y cols., 1991
<b>P/NP</b>	C-Pu, Hipotálamo		Hipófisis	Froehlich y cols., 1987

Abreviaturas: Hipof., hipófisis; Acb, Núcleo accumbens; VTA, área del tegmento ventral; C-Pu, Núcleo Caudado-Putamen; Hipocam., hipocampo; Hipotal., hipotálamo; SN, sustancia nigra

**Tabla I-8. Efectos agudos y crónicos sobre los niveles de Met-encefalina en varias regiones cerebrales.**

Region		Agudo		Crónico
<b>C-Pu</b>	↑	Schulz y cols., 1980 Seizinger y cols., 1983	↓	Schulz y cols., 1980; Seizinger y cols., 1983; Nylander y cols., 1984
<b>Hipocampo</b>	-	Seizinger y cols., 1983	-	Seizinger y cols., 1983
<b>Hipotálamo</b>	- ↑	Schulz y cols., 1980 Seizinger y cols., 1983	↓ -	Seizinger y cols., 1983 Nylander y cols., 1984
<b>Médula</b>	-	Schulz y cols., 1980	↓	Schulz y cols., 1980
<b>Midbrain</b>	- ↑	Schulz y cols., 1980 Seizinger y cols., 1983	-	Schulz y cols., 1980 Seizinger y cols., 1983
<b>Acb</b>	↑ (ARNm)	Li y cols., 1998	↑	Nylander y cols., 1984
<b>Hipófisis</b>			↑	Nylander y cols., 1984
<b>VTA</b>			-	Nylander y cols., 1984

Abreviaturas: Acb, Núcleo accumbens; VTA, área del tegmento ventral; C-Pu, Núcleo Caudado-Putamen

(Tabla I-7) como en la expresión génica de proencefalina. En aquellos estudios crónicos que determinan la encefalina podemos encontrar trabajos en los que se observan aumentos en el contenido del péptido en distintas regiones cerebrales (Nylander y cols., 1994; Lucchi y cols., 1984) frente a otros que muestran disminuciones o incluso falta de efecto (Schulz y cols., 1980; Seizinger y cols., 1983). Por su parte, los estudios de expresión génica de proencefalina, han revelado disminuciones en los niveles del ARNm de PENK en el núcleo accumbens, núcleo caudado-putamen o el tubérculo olfatorio en ratas Fawn-Hooded frente a ratas Wistar (Cowen y cols., 1998; Cowen y cols., 1999a) o el aumento de los niveles de ARNm de PENK en los núcleos de la amígdala (Cowen y cols., 1999a)

#### 2.1.3.- Etanol y el sistema dinorfinérgico.

El papel concreto que desempeña el sistema dinorfinérgico en el consumo de etanol es todavía desconocido, sin embargo, parece que la dinorfina no interviene de forma decisiva en la inducción al alcoholismo puesto que la proporción de alcohólicos crónicos, sin variaciones en su polimorfismo en el gen que codifica para la dinorfina no varía frente a la población general (Geijer y cols., 1997).

Seizinger y cols. (1983) y Milton y Erickson (1991) observaron que la ingesta crónica de etanol hizo disminuir los niveles de dinorfina en el hipotálamo y el hipocampo. Además, otros autores utilizando animales preferentes encontraron que el consumo crónico de etanol en ratones C57BL6 hizo incrementar el ARNm de prodinorfina en el hipotálamo, el hipocampo, el núcleo accumbens, el núcleo caudado-putamen, el septo y el tubérculo olfatorio y el tálamo (Gulya y cols., 1983; Marinelli y cols., 2000).

En estudios en los que compararon ratas y ratones preferentes (AA y C57BL/6) frente a ratas y ratones no preferentes (ANA y DBA/2), se encontró que en los animales preferentes los niveles de dinorfina y expresión génica de prodinorfina eran inferiores a los encontrados en animales no preferentes en el núcleo accumbens y en el área ventral tegmental (Nylander y cols., 1994; Jamensky y Gianoulakis, 1997). Estos autores, sugirieron



la posibilidad de que los niveles bajos de dinorfina encontrados en el núcleo accumbens podrían motivar el consumo de etanol, puesto que la dinorfina, actuando a través de los receptores  $\kappa$ , podría inhibir la liberación de dopamina (Di Chiara e Imperato, 1988b).

## ***2.2. Interacciones etanol-receptores opioides.***

El consumo de etanol puede alterar no solo la actividad peptidérgica del sistema opioide endógeno como hemos visto, sino que también puede alterar la afinidad o la densidad de los receptores opioides en distintos lugares cerebrales.

Numerosas evidencias indican que tanto la ingesta aguda como crónica de etanol pueden afectar a los receptores opioides lo que podría regular algunos de los efectos neurocomportamentales del etanol, incluyendo el refuerzo. Los estudios relativos a la funcionalidad receptorial del sistema opioide no son consistentes debido a las diferentes regiones cerebrales seleccionadas para llevar a cabo estos estudios, la concentración de etanol utilizada, la presencia o no de etanol en los medios de cultivo durante los estudios in vitro, así como las especies, razas y líneas de animales utilizados.

Los primeros estudios in vitro realizados en preparaciones de membranas cerebrales expuestas a etanol disminuyeron de manera selectiva la unión al receptor  $\delta$  pero no la de los receptores  $\kappa$  o  $\mu$  (Hiller y cols., 1981; Gianoulakis, 1983) aunque posteriormente otros estudios observaron un aumento de unión de los receptores  $\mu$  (Gianoulakis, 1983; Hoffman y cols., 1984). Los primeros estudios revelaron que la administración prolongada de etanol disminuía la unión a los receptores  $\delta$  (Charness, 1983; Gianoulakis, 1983; Hynes y cols., 1983; Charness y cols., 1983) pero que los efectos sobre la unión a los receptor  $\mu$  no eran consistentes pues se hallaron resultados muy dispares (Gianoulakis, 1983; Tabakoff y Hoffman, 1983; Tabakoff y cols., 1981; Hoffman y cols., 1982; Khatami y cols., 1987).

En estudios más recientes, las técnicas autorradiográficas nos han permitido investigar los efectos del etanol en regiones específicas del cerebro y el desarrollo de

ligandos más selectivos ha permitido una mejor caracterización de los efectos del etanol en receptores opioides específicos. Así, el consumo crónico voluntario de etanol en ratas preferentes Sardinian (S) aumentó la unión a los receptores  $\mu$  y  $\delta$  en el núcleo caudado-putamen pero sin tener efecto sobre otras regiones (Fadda y cols., 1999). Sin embargo, la administración de etanol en ratas Wistar indujo una disminución de los receptores  $\mu$  en el núcleo accumbens y el núcleo caudado-putamen sin afectar en absoluto a los receptores  $\delta 1$  y  $\delta 2$  (Turcham y cols., 1999). Todos estos datos confirman que la administración de etanol induce cambios distintos en los receptores según las regiones investigadas y las especies y líneas de animales utilizadas.

A pesar de la de estudios, podemos comprobar que existe una relación estrecha entre los efectos del etanol y los receptores opioides a través de los estudios realizados con los modelos de auto-administración en los que se observa una disminución del consumo de etanol gracias a la utilización de antagonistas específicos y no específicos de los receptores opioides (Altshuler y cols., 1980; O'Malley, 1996; Sandi y cols., 1988). Tales estudios demuestran que los antagonistas de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  son más efectivos a la hora de disminuir el consumo de etanol (Altshuler y cols., 1980; O'Malley, 1996) que los antagonistas de los receptores  $\kappa$  (Di Chiara e Imperato, 1988; Spanagel, 1996). Además, la microinyección de oligonucleótidos antisentido frente al receptor  $\mu$  en el núcleo accumbens modifica la conducta de consumo de etanol en ratas preferentes HEP (Myers y Robinson, 1999). Además, los animales carentes de  $\beta$ -endorfina, tienen que esforzarse para poder consumir el etanol en modelos de autoadministración oral o intravenosa (Grisel y cols., 1999; Graham y cols., 1998). Por otra parte, la carencia de expresión del receptor  $\mu$  en animales disminuyó la preferencia y la auto administración de soluciones alcohólicas (Hall y cols., 1999, 2001; Roberts y cols., 2000).

Se han podido observar diferencias en la densidad de los tres receptores opioides en ratas y ratones preferentes y no preferentes en distintas áreas cerebrales implicadas en procesos de recompensa y refuerzo (de Waele y cols., 1995; Jamensky y cols., 1997; de Waele y Gianoulakis, 1997). Por lo que respecta al receptor  $\mu$  se ha observado que las ratas

preferentes AA y P, poseen mayor densidad de receptores en el núcleo accumbens periférico, en la corteza prefrontal o el sistema límbico frente a las ratas ANA y NP ([Marinelli y cols., 2000](#); [McBride y cols., 1998](#)). Sin embargo no se encontraron diferencias en el ARNm del receptor  $\mu$  entre ratas HAD y LAD ([Gong y cols., 1997](#)). Con respecto al receptor  $\delta$ , existen algunas divergencias en los resultados obtenidos entre los distintos autores. Mientras que algunos estudios han encontrado mayor densidad en el núcleo accumbens en ratas AA ([de Waele y cols., 1995](#)), otros han encontrado tanto una disminución en el receptor  $\delta$  en ratas AA ([Soini y cols., 1998](#)) o incluso han revelado la carencia de diferencias entre ratas AA y ANA ([Soini y cols., 1999](#)). En los ratones preferentes D57BL/6 también se han encontrado mayor densidad de receptores  $\delta$  y  $\kappa$  frente a ratones no preferentes DBA/2 ([Jamensky y cols., 1997](#); [de Waele y Gianoulakis, 1997](#)).

Estos estudios comparativos indican que no hay un elemento común del sistema de receptores opioides que sea directamente responsable del consumo excesivo de etanol. Además, esta observación está de acuerdo con los estudios que demuestran que aunque los antagonistas del receptor  $\mu$  son más efectivos en la reducción del consumo de etanol en ratas AA ([Honkanen y cols., 1996](#)), los antagonistas del receptor  $\delta$  son más efectivos en la reducción de la ingesta de etanol en ratones C57BL/6 ([Le y Chow, 1992](#)) al igual que en ratas P y HAD ([Froehlich y cols., 1991](#); [Krishnan-Sarin y cols., 1995a](#); [Krishnan-Sarin y cols., 1995b](#)).

Tanto en animales como en estudios clínicos se ha podido también demostrar que la administración de antagonistas opioides no específicos, como naloxona o naltrexona, al igual que antagonistas selectivos de los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$  reducen el consumo de etanol en aquellas personas con dependencia alcohólica ([Herz, 1997](#); [Volpicelli y cols., 1992](#); [O'Malley, 1996](#); [Heiser y cols., 1999](#); [Di Chiara e Imperato, 1988](#); [Spanagel y cols., 1992](#)). Además, la naltrexona es un compuesto eficaz para evitar las recaídas y reducir el deseo compulsivo por el etanol cuando se combina con terapia comportamental ([O'Malley, 1996](#)).

Después de los estudios iniciales de la efectividad de la naltrexona en la reducción del consumo de etanol en los humanos, se llevaron a cabo un numero importante de estudios

para entender el mecanismo por el cual la naltrexona reducía el consumo de etanol. Aunque el principal mecanismo de acción considerado es la inhibición de los efectos reforzantes positivos del etanol (Cole y cols., 2000) los estudios en animales de experimentación han demostrado que la administración crónica de naltrexona produce aumentos en la expresión y liberación de los péptidos opioides (Tempel y cols., 1990; Gianoulakis y Gupta, 1986a, b) y en la densidad de los receptores opioides (Rothman y cols., 1990; Overstreet y cols., 1999) sugiriendo una regulación al alza de tono el sistema opioide endógeno. Sin embargo, esto hace que la naltrexona disminuya su efectividad en la prevención de recaídas, a menos que otro mecanismo no opioide esté implicado en su éxito terapéutico a largo plazo. Además, los sujetos que han tomado naltrexona, cuando consumen etanol, perciben un aumento de sedación y sensaciones subjetivas negativas y una disminución de sensaciones placenteras, y de deseo por la bebida sin alterar los parámetros objetivos o subjetivos de la borrachera (McCaul y cols., 2000).

## ***El Etanol y el Sistema Dopaminérgico***

### **1. Biosíntesis de la dopamina. La tiroxina hidroxilasa.**

La tirosina hidroxilasa es la primera enzima en la biosíntesis de la dopamina y la última de toda la vía en identificarse ([Udenfriend y cols., 1964](#)). Se encuentra distribuida en la medula adrenal, el cerebro y en los tejidos con inervación simpática. Además, parece ser el único constituyente en las neuronas catecolaminérgicas y células cromafines desapareciendo completamente de los tejidos renal y cardíaco, de las glándulas salivares y los vasos deferentes tras la denervación simpática. El gen humano de la tirosina hidroxilasa ya ha sido clonado y un único gen codifica para diversos ARNm heterogéneos en su extremo 5' terminal de la región de codificación siendo el significado funcional de estas diferencias aún desconocido.

La tirosina hidroxilasa es una enzima estérico específica que requiere de  $O^{2+}$   $Fe^{2+}$  y de tetrahidropterina como cofactor para llevar a cabo su actividad mostrando un grado alto de especificidad por su sustrato. A diferencia de la tirosinasa, la tirosina únicamente oxida L-tirosina y en menor medida la L-fenilalanina.

La  $K_m$  de la conversión de tirosina a DOPA por tirosina hidroxilasa es de  $2 \times 10^{-5}$  M y en una preparación de sinaptosomas de  $0,4 \times 10^{-5}$  M. La hidroxilación de la enzima es el paso limitante en la biosíntesis de la noradrenalina en el sistema nervioso periférico al igual que de la biosíntesis de noradrenalina y dopamina en el cerebro. En la mayoría de tejidos inervados por el SNs incluyendo el cerebro, la actividad de la DOPA descarboxilasa y de la dopamina- $\beta$ -oxidasa son 100 y 1000 veces mayor que la tirosina hidroxilasa. Esta inferior actividad de la enzima puede deberse a una menor cantidad de esta o a su menor eliminación. Puesto que se ha podido demostrar que la enzima es el paso limitante de la reacción de biosíntesis de las catecolaminas es lógico que la intervención farmacológica en este paso causase una disminución en la biosíntesis de noradrenalina. Se han llevado a cabo experimentos para producir una simpatectomía química a través del bloqueo de los dos últimos pasos de la biosíntesis de la noradrenalina pero fracasaron, solo los estudios utilizando inhibidores de la tirosina hidroxilasa han demostrado ser más efectivos en la reducción de la biosíntesis de noradrenalina y dopamina endógena en corazón, bazo y otros tejidos inervados por el SNs. Los principales inhibidores de la enzima se pueden englobar en cuatro grupos: 1) aminoácidos homólogos (ej.  $\alpha$ -metil-p-tirosina y su éster metílico), 2) derivados de catecoles, 3) tropolonas y 4) quelantes selectivos de hierro.

## **2. Receptores dopaminérgicos.**

La dopamina media sus acciones neuroquímicas y fisiológicas a través de receptores de membrana. Los receptores dopaminérgicos se encuentran en las neuronas postsinápticas en regiones cerebrales ricas en dopamina y en las neuronas presinápticas (autoreceptores) de los cuerpos neuronales y las dendritas en neuronas del cerebro medio y anterior. La estimulación de estos autoreceptores inhibe la síntesis de la dopamina por bloqueo de la tirosina hidroxilasa, además de bloquear la liberación presináptica de las vesículas de dopamina disminuyendo de forma considerable la tasa de disparo de la neurona (Chiodo y cols., 1995; Roth y Elsworth, 1995).

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G que están caracterizados por tener siete dominios transmembrana hidrofóbicos y el extremo amino terminal intracitosólico que interactúa con las proteínas G y otras moléculas efectoras para mediar los efectos fisiológicos y neuroquímicos de los receptores (Baldessarini y Tarazi, 1996; Florijn y cols., 1997; Cooper y cols., 1991; Carlsson, 1993).

Los receptores dopaminérgicos clonados hasta el momento presente pueden dividirse fundamentalmente en dos grupos (Kebabian y Calne, 1979) basándose en la capacidad de la dopamina para estimular la adenilato ciclasa y producir AMP cíclico de manera que podemos hablar de un grupo tipo receptor dopaminérgico  $D_1$  formado por los receptores  $D_1$  y  $D_5$  que median la producción de AMP cíclico y un grupo tipo receptor dopaminérgico  $D_2$  formado por los receptores  $D_2$ ,  $D_3$ , y  $D_4$ , que median la inhibición de la síntesis de AMPc. En general, los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$  son más abundantes y se encuentran distribuidos más ampliamente en el sistema nervioso central con respecto al resto de receptores dopaminérgicos. Esta distribución extensa de las células que expresan los ARNm de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$  reflejan el número amplio de funciones que median ambos receptores en el sistema nervioso central, que incluyen la modulación de las funciones cognitivas, sensorimotoras y neuroendocrinas.

### **2.1. Receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>.**

Como se ha comentado anteriormente el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> es el más abundante en el SNC. El gen del receptor D<sub>1</sub> se encuentra localizado en el cromosoma 5 humano (Tabla I-9) y tras el proceso de corte y empalme, codifica una proteína de 446 aminoácidos (Dearry y cols., 1990). El receptor D<sub>1</sub> estimula la adenilato ciclasa y genera inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol por la vía de la activación de la fosfolipasa C (Mahan y cols., 1990; Monsma y cols., 1990). El receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> se encuentra distribuido ampliamente en los ganglios basales, la corteza cerebral, el hipotálamo y el tálamo. En las neuronas del núcleo estriado de los ganglios basales se ha podido colocalizar el ARNm del receptor D<sub>1</sub> con el ARNm de DARPP-32 (una fosfoproteína que regula el AMPc y la dopamina con una masa molecular de 32 kD) que parece podría contribuir a las acciones del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> (Hemmings y Greengard, 1986; Hemmings y cols., 1987).

### **2.2. Receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>.**

El receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> fue el primero en ser clonado en 1988 por Bunzow y cols. El gen del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> codifica una proteína con 415 aminoácidos (Tabla I-9) y se localiza en q22-q23 del cromosoma 11.

El receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> se encuentra en diversas cascadas de transmisión de señales como la inhibición de la síntesis de AMP cíclico (Vallar y Meldolesi, 1989), la inhibición de la eliminación del fosfoinositol (Enjalbert y cols., 1986), la activación de los canales de potasio y el aumento de liberación de ácido araquidónico (Kanterman y cols., 1991).

Los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> se encuentran ampliamente distribuidos en los ganglios basales y el área ventral tegmental (Bonthenent y cols., 1991).



Desde un punto de vista molecular, existen dos isoformas para el receptor dopaminérgico  $D_2$ , la  $D_{2L}$  y la  $D_{2S}$ . Ambas isoformas varían según las especies en la presencia o ausencia de 29 aminoácidos en el tercer dominio citoplasmático de la cadena peptídica. Desde un punto de vista farmacológico, ambas isoformas muestran perfiles similares para su unión a fármacos selectivos para el receptor  $D_2$  a la vez que ambos inhiben la actividad adenilato ciclasa pero sin embargo sus respuestas varían al unírseles la dopamina. Por un lado, la unión de la dopamina induce la regulación al alza de la subunidad  $D_{2L}$  y la regulación a la baja de la subunidad  $D_{2S}$  (Zhang y cols., 1994).

### **2.3. Receptor dopaminérgico $D_3$ .**

El gen para el receptor dopaminérgico  $D_3$  posee 5 intrones que codifican una proteína de 446 aminoácidos (Sokoloff y cols, 1990) y se encuentra situado en el cromosoma 3. El receptor  $D_3$  tiene ciertas similitudes estructurales y farmacológicas al receptor  $D_2$  y al igual que sucede con este el ARNm de este sufre procesos de corte y empalme distintos generando dos mensajeros de distinta longitud a partir del mismo gen (Giros y cols., 1991). La distribución del ARNm del receptor dopaminérgico  $D_3$  indican que estos receptores se expresan principalmente en regiones límbicas subcorticales que incluyen la isla de Calleja, el septo del núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio y en escasa cantidad en los ganglios basales (Tabla I-9)(Bonthenent y cols., 1991). Sorprendentemente, se han encontrado receptores  $D_3$  en el cerebelo que podría regular los movimientos de los ojos. El estado funcional molecular del receptor dopaminérgico  $D_3$  no está del todo claro hasta el momento pues ni se acopla a proteínas G ni traduce consistentemente un mecanismo efector pero su parecido estructural al receptor  $D_2$  permitiría pensar que inhibiría la actividad de la adenilato ciclasa en su función habitual. Los últimos estudios demuestran que el receptor  $D_3$  podría mediar las influencias positivas reguladoras de la dopamina en la producción de neurotensina (Lévesque y cols., 1995).

#### **2.4. Receptor dopaminérgico D<sub>4</sub>.**

El receptor dopaminérgico D<sub>4</sub> contienen cuatro intrones que codifican para una proteína de 387 aminoácidos (Van Tol y cols., 1991). La homología encontrada entre el receptor dopaminérgico D<sub>4</sub> y los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> es del 41% y 39% respectivamente, llegando a ser del 56% si comparamos exclusivamente sus segmentos transmembranales. El gen que codifica el receptor dopaminérgico D<sub>4</sub> se encuentra situado en la punta del brazo corto del cromosoma 11 (Gelernter y cols., 1992). El receptor se localiza en regiones como el hipocampo o la corteza prefrontal (Meador-Woodruff y cols., 1994). Al igual que ocurre con los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, la estimulación del receptor dopaminérgico D<sub>4</sub> puede inhibir la actividad de la adenilato ciclasa y activar la liberación de ácido araquidónico en las neuronas cerebrales (Tabla I-9) (Chio y cols., 1994).

#### **2.5. Receptor dopaminérgico D<sub>5</sub>.**

El gen del receptor dopaminérgico D<sub>5</sub> codifica una proteína de 447 aminoácidos con un 50% de homología con el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> y un 80% comparando solamente los siete dominios transmembrana.

El gen que codifica para el receptor dopaminérgico humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (Giros y cols., 1990). La expresión del receptor dopaminérgico D<sub>5</sub> se limita al hipocampo y al núcleo parafascicular del tálamo (Meador-Woodruff y cols., 1992) cuya función parece estar relacionada con la percepción del dolor con lo que parece que este receptor podría estar involucrado en el procesamiento del estímulo doloroso (Giesler y cols., 1979). Los receptores D<sub>5</sub>, al igual que los D<sub>1</sub>, median su actividad a través de las proteínas G activando la adenilato ciclasa y tienen una alta afinidad por la dopamina y los agonistas del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> selectivos (Tabla I-9) (Sunahara y cols., 1991).

**Tabla I-9. Propiedades de los receptores dopaminérgicos.**

Receptor	Amino ácidos	Cromoso ma	Distribución	Agonistas	Antagonistas	Efectores
<b>Tipo D<sub>1</sub></b>						
D <sub>1</sub>	446 (h) 446 (r)	5	Gánglios Basales N.Accumbens Corteza Cerebral	OH-benzacepinas A-68930 CY- 208-245 Dihirexidinas	Halobenzacepinas (SCH-23390) Tioxantenos	AC(+) PLC(+)
D <sub>5</sub>	477 (h) 475 (r)	4	Hipocampo Tálamo	OH-benzacepinas	Halobenzacepinas	AC(+)
<b>Tipo D<sub>2</sub></b>						
D <sub>2</sub>	443 (h)	11	H. Anterior Ganglios Basales	Ergolinas Hyroxiaporfinas Aminotetralinas	Benzamidas Butirofenonas Fenotiazinas	AC(-) PLC(-); AA(+) Canales K <sup>+</sup> (-) y Ca <sup>2+</sup> (-)
D <sub>3</sub>	440 (h) 444 (r)	3	Islas de Calleja T. Olfatorio Cerebelo	(+)7-OH-DPAT (+)PD-128,907	Nafadotrine S-14297	
D <sub>4</sub>	387 (h) 368 (r)	11	Hipocampo Amígdala	CP-226,269 PD-106,077	L-745,870 U-101,387 RBI-257 NGD-94-1	AC(-) AA(+)

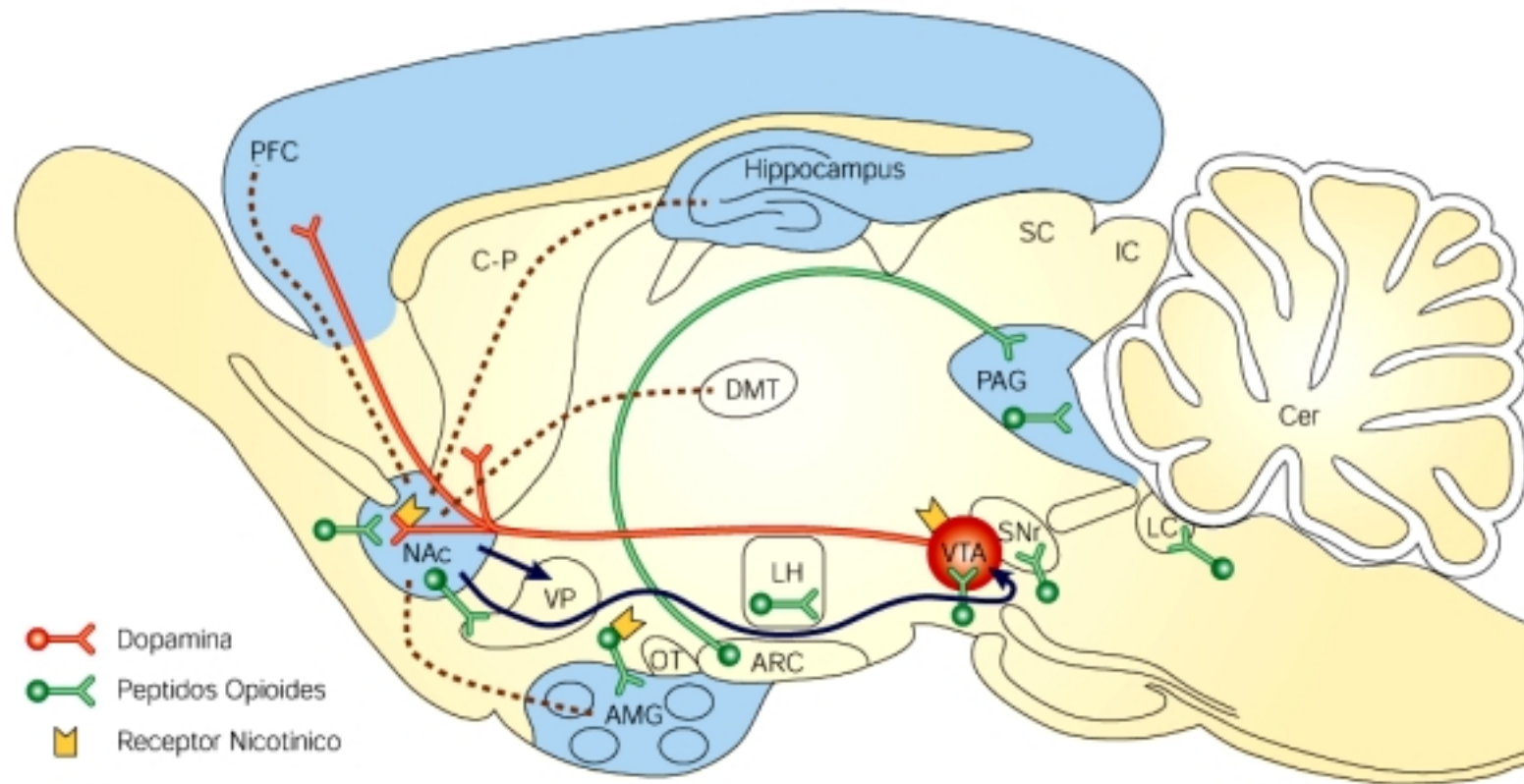
### 3. Interacción etanol-sistema dopaminérgico.

La conducta adictiva asociada al alcoholismo se caracteriza por la compulsión en la obtención del etanol, la pérdida de control del consumo y el desarrollo de tolerancia y dependencia. Al igual que en otras adicciones, el alcoholismo se caracteriza por la vulnerabilidad crónica a las recaídas después del cese del consumo de la droga. Para entender los factores que llevan a los individuos al consumo excesivo de etanol, la investigación se ha centrado en la identificación de los mecanismos cerebrales que

sustentan los efectos reforzantes del etanol y los cambios neuroadaptativos progresivos que se producen por su consumo que conducen al desarrollo de la dependencia.

Los cuerpos celulares del sistema mesocorticolímbico se originan en el área del tegmento ventral, descrito como grupo A10 de neuronas catecolaminérgicas (Dahlström y Fuxe, 1964; Lindvall, 1979), y se proyectan al cerebro anterior, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza frontal y área del septo (Figura I-2). Se ha propuesto que este sistema modula la actividad del núcleo accumbens, una región que parece ser la vía final común en la regulación de las acciones reforzantes positivas de las drogas de abuso que consumen los humanos (Robbins y Everitt, 1996). Además este núcleo tiene también funciones importantes en la motivación por la obtención de comida y agua y en la asociada al comportamiento sexual y maternal (Robbins y cols., 1989; Heimer y cols., 1995). Al núcleo accumbens llegan proyecciones de diversos sistemas de neurotransmisores procedentes del área ventral tegmental, la amígdala, la corteza frontal, el hipocampo y el núcleo dorsal del tálamo, entre otras regiones cerebrales. A su vez, el núcleo accumbens envía eferentes al área ventral tegmental y al núcleo pálido ventral (Figura 2). El núcleo accumbens es una estructura heterogénea con dos zonas claramente diferenciadas en sus propiedades anatómicas, neuroquímicas y funcionales: una zona medial denominada centro y otra más lateral denominada periférico (Heimer y cols., 1995).

El etanol es un reforzador positivo por lo que ha prevalecido la investigación de la activación la función dopaminérgica en el área ventral tegmental del circuito cerebral de recompensa (sistema mesolímbico dopaminérgico). Se ha demostrado que el etanol aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (Gessa y cols., 1995; Brodie y cols., 1990) a través de una activación celular excitatoria (Brodie y cols., 1999). Además, empleando metodologías como la microdiálisis y la voltametría, en los últimos años se ha comprobado que la administración de la mayoría de las drogas de abuso producen aumentos de la dopamina extracelular en el núcleo accumbens (Di Chiara y Imperato, 1988) aunque datos recientes han evidenciado que son



**Figure I-2.** Circuitos neurales de adicción. Las líneas punteadas indican aferencias al núcleo accumbens (NAc). Las líneas azules eferencias desde el núcleo accumbens implicadas en el efecto reforzante de las drogas. Las líneas rojas muestran proyecciones del sistema mesolímbico dopaminérgico que parece fundamental en el refuerzo de las drogas. Las neuronas dopaminérgicas tienen su origen en el área ventral tegmental (VTA) y se proyectan al NAc y otras estructuras límbicas que incluyen el tubérculo olfatorio (OT), el núcleo caudado-putamen ventral (C-P), la amígdala (AMG) y la corteza prefrontal (PFC). Las líneas verdes muestran neuronas con péptidos opioides endógenos, implicados en el refuerzo de etanol y otras drogas de abuso. Estos sistemas péptidos opioides incluyen circuitos encefalinérgicos locales (segmentos cortos) y el circuito endorfinérgico hipotálamo-cerebro medio (segmento largo). Las regiones sombreadas de azul muestran la distribución aproximada del receptor gabérgico GABA-A que contribuye en el efecto reforzante del etanol. Las estructuras amarillas indican la localización de receptores nicotínicos que parece localizados en neuronas dopaminérgicas y opiodérgicas. (ARC, núcleo arqueado; Cer, cerebelo; DMT, tálamo dorsomedial; IC, colículo inferior; LC, locus coeruleus; LH, hipotálamo lateral; PAG, sustancia gris periacueductal; SC, colículo superior; SNr, sustancia nigra parte reticulata; VP, núcleo pálido ventral).

acciones directas sobre los cuerpos neuronales de las neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental más que sobre las terminaciones dopaminérgicas en el núcleo accumbens (Yim y Gonzalez, 2000; Budygin y cols., 2001), si bien se desconoce si este aumento de la dopamina extracelular tiene una relación directa con las acciones reforzantes de las drogas o más bien tiene solamente la función anticipatoria de señalar que se va a producir el refuerzo (Blackburn y cols., 1987; Salomone y cols., 1994; Kiyatkin y Gratton, 1994).

Existen varias evidencias que confirmar el papel fundamental de la dopamina en los efectos reforzantes del etanol como son, el mantenimiento de la autoadministración de etanol tras la microinyección de etanol en el área ventral tegmental (Gatto y cols., 1994), el aumento dosis dependiente de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens en animales autoadministrados con etanol (Weiss y cols., 1993, 1996) o la reducción de los efectos reforzantes de la droga debida a la utilización de fármacos en el área ventral tegmental o el núcleo accumbens que interfieren en la transmisión dopaminérgica (Myers y Robinson, 1999; Samson y Harris, 1992; Hodge y cols., 1997). Además, la manipulación de la expresión génica de los receptores dopaminérgicos y la utilización de animales desprovistos de esos mismos receptores apoyan el papel de la dopamina en los efectos reforzantes del etanol (El-Gundhi y cols., 1998; Cunnigham y cols., 2000; Risinger y cols., 2000, 2001).

Tomando en consideración la información de que disponemos unida a los estudios de imagen en roedores (Williams-Hemby y Porrino, 1997) se podría sugerir que la estimulación dopaminérgica en el núcleo accumbens es necesaria para aquellos efectos reforzantes asociados con la estimulación del alcohol a dosis bajas pero no esencial para otras acciones como, los efectos ansiolíticos.

A pesar de que el consumo agudo de etanol activa la neurotransmisión dopaminérgica, la abstinencia tras el consumo crónico conduce a disminuciones en la actividad dopaminérgica en el área ventral tegmental (Diana y cols., 1992; Shen y Chiodo,

1993) y en los niveles extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens (Rosetti y cols., 1992; Weiss y cols., 1996). Esta circunstancia indica que la ingesta crónica de etanol induce hipofunción dopaminérgica, lo que lleva al mantenimiento del consumo de etanol y por tanto contribuye al desarrollo de la dependencia, por la aparición de un proceso compensatorio debido a la disminución de la efectividad en la liberación de dopamina.

En los últimos años, se han obtenido resultados que han mejorado nuestros conocimientos sobre los mecanismos que subyacen en la disfunción dopaminérgica durante la ingesta crónica de etanol y la abstinencia. Por ejemplo, se ha informado de un incremento de la actividad de los canales de calcio tipo L durante la abstinencia cuyo bloqueo con antagonistas cesa los efectos del cese de consumo de etanol (Rosetti y cols., 1999) o la disminución de la expresión de la tirosina hidroxilasa asociada al aumento en los niveles del transportador de dopamina en ratas con dietas alcohólicas (Rothblat y cols., 2001). Este último resultado contrasta con el encontrado en humanos alcohólicos en los que la unión al transportador de dopamina es baja en los primeros estadios de la abstinencia regresando a niveles normales con la abstinencia bien instaurada (Laine y cols., 1999). Estos resultados, sin embargo, deben interpretarse con precaución puesto que la unión al transportador de dopamina en humanos se realizó al cuarto día de abstinencia y no inmediatamente después del cese del consumo de etanol.

## ***Modelos Experimentales del Alcoholismo***

Los modelos animales de estudio son herramientas importantes para dilucidar las funciones normales y anormales del sistema nervioso humano y de la conducta. Un modelo animal perfecto de estudio debe poseer idénticas características que en los humanos aunque es poco frecuente exceptuando las patologías asociadas a mutaciones monogénicas. Sin embargo, un modelo animal útil es aquel que tiene una analogía muy cercana al problema a estudiar, entendiendo por analogía la capacidad de revelar ciertos aspectos de un proceso complejo que nos permita entender sobre el estado del ser humano a través de hipótesis planteadas en el hombre. De esta manera, la elección de la especie animal, su carga genética y las variables experimentales y ambientales son de especial importancia en la simulación del estado humano.



Durante un tiempo existieron dudas sobre la viabilidad y la utilidad de los estudios del alcoholismo en primates "no humanos" y en animales inferiores (roedores) debido a que el consumo oral de etanol en estos animales no era suficiente para la obtención de niveles farmacológicos de etanol en sangre a menos que se produjeran manipulaciones tales como la reducción de peso, la inducción de polidipsia u otras. Esto no solo no es así, sino que es bien conocido que los animales de experimentación, como los roedores, muestran una intensa conducta de preferencia al consumo de etanol (Richter y Campbell, 1940) y que esta varía genéticamente (McClearn y Rodgers, 1959).

El objetivo prioritario de la investigación en alcoholismo es explicar porque beben las personas, porque en exceso y porque algunas no pueden dejar de beber incluso cuando se dan cuenta del estado físico deplorable en el que se hallan. Aunque el alcoholismo es únicamente un problema humano, se han llevado a cabo innumerables esfuerzos para desarrollar modelos animales de autoadministración de etanol y así usarlos para dilucidar los substratos neuroquímicos que llevan al consumo excesivo de etanol. Los animales más utilizados como modelo animal han sido las ratas y muchos han sido los métodos para inducir a estos animales al consumo de etanol. Entre estos métodos cabe destacar la disponibilidad programada (Holloway y cols., 1984), la polidipsia inducida por programa (Meisch, 1977), el consumo de sacarosa por condicionamiento operante (Samson, 1986) o la inducción previa al desarrollo de tolerancia y dependencia física (Deutsch y Eisner, 1977). En la actualidad, el programa de condicionamiento operante desarrollado por Samson (1986) esta siendo ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos del sistema nervioso central que median los efectos reforzantes del etanol, aunque el método de mayor éxito para desarrollar animales que consuman etanol ha sido el genético mediante la utilización de líneas de roedores con alta predisposición voluntaria al consumo de etanol a partir de la selección de camadas.

## **1. Modelos motivacionales de consumo de etanol.**

Las causas de un consumo excesivo de etanol y del alcoholismo son complejas reflejando las interacciones existentes entre factores genéticos, ambientales y socioculturales. Entre estos factores se encuentran los efectos motivacionales positivos y negativos a menudo analizados como factores importantes en la conducta de búsqueda de la droga. Estos efectos positivos y negativos, son importantes para determinar si las personas que beben continuarán consumiendo etanol y si incrementarán sus niveles de ingesta en el futuro (Tabakoff y Hoffman, 1988). Considerando la teórica importancia de los efectos motivacionales en el consumo de etanol, se han desarrollado modelos animales (monos y roedores) que permitan el estudio de estos efectos en el consumo de etanol. Estos modelos de estudio son el modelo de autoadministración y los modelos por condicionamiento. Además, los investigadores utilizan igualmente estos modelos para estudiar desde un punto de vista neurobiológico y genético los mecanismos que subyacen en los efectos motivacionales del etanol y desarrollar de esta manera intervenciones conductuales y farmacológicas que permitan alterar estos efectos.

### ***1.1. Modelos animales de auto administración de etanol.***

En los modelos de autoadministración, los animales controlan su propio consumo de etanol determinando la cantidad de etanol consumido y un patrón de consumo propio. Entre los modelos de autoadministración más comúnmente utilizados se encuentran el modelo preferencial de consumo y el modelo de autoadministración por condicionamiento operante.

#### **1.1.1. Modelo preferencial de consumo de etanol.**

Uno de los métodos más utilizado por los investigadores para simular el consumo humano de etanol en roedores es el estudio de preferencia de consumo de etanol. Este método consiste en ofrecer la posibilidad de elegir libremente al animal el consumo de

agua o etanol a distintas concentraciones (Figura I-3). Desde un punto de vista experimental, la preferencia por el etanol se examina durante semanas utilizando dos o tres botellas en el diseño del experimento y con comida *ad libitum*. En muchos experimentos, las botellas están disponibles las 24 h del día (patrones de acceso continuo) y en otros solo durante unas horas (patrones de acceso limitado). La utilización de un patrón u otro solo dependerá de cómo pretenda el investigador que sea el consumo de etanol en el tiempo, de manera que, si utiliza el patrón de acceso continuo el consumo de etanol se realizará en pequeñas dosis espaciadas en el tiempo que no tienen porque ocasionar altos niveles de etanol en el cerebro. Sin embargo, el patrón de acceso limitado puede provocar un consumo de etanol relativamente alto en un corto espacio de tiempo (Marcucella, 1989).

Los animales como los humanos no consumen grandes cantidades de etanol la primera vez que entran en contacto con la droga, de manera que se han buscado procedimientos para comenzar la ingesta y permitir así al animal experimentar sus efectos motivacionales. Una estrategia común es la introducción del etanol a dosis relativamente bajas que irán incrementándose a lo largo del experimento. Otra estrategia muy utilizada es mezclar el etanol con una solución azucarada (sacarina o sacarosa generalmente) cuya concentración irá disminuyendo en el tiempo.

Este tipo de experimentos se han utilizado para caracterizar las diferencias de ingesta de etanol entre distintas razas de ratas y ratones (Li y Lumeng, 1984; McClearn y Rodgers, 1959). La amplia variabilidad en la preferencia por el etanol entre animales y cepas ha permitido seleccionar camadas de ratas según su preferencia por el consumo de etanol de manera que se han originado dos grupos distintos de animales dentro de la misma cepa. Las mejores parejas de animales estudiadas son el modelo Alko Alcohol (AA) y Alko NonAlcohol (ANA), seleccionadas en 1963 (Eriksson, 1968) y caracterizadas por su rechazo o aceptación de soluciones alcohólicas al 10%, el modelo de ratas preferentes (P) que consumen entre 5-8 g/Kg/día de etanol llegando a alcanzar 50-200 mg/100mL y ratas no preferentes (NP) cuyo consumo esta en 0,5 g/Kg/día (McBride y Li, 1998), el modelo de



**Figura I-3.** Representación gráfica del método preferencial de consumo de etanol

rata preferente de Cerdeña (sP) utilizado como modelo desde hace más de 20 años (Colombo, 1997), el modelo de las ratas de la Universidad de Chile A (UchA) o B (UchB) (Mardones y Segovia-Riquelme, 1983) o el modelo de ratas altamente bebedoras (HAD) o poco bebedoras (LAD) (Li y cols., 1993).

Todos estos modelos han sido extensamente utilizados para caracterizar los mecanismos moleculares, neuroquímicos y conductuales de la preferencia y voluntariedad del consumo de etanol.

#### 1.1.2. Modelo de autoadministración por condicionamiento operante.

En los experimentos de autoadministración por condicionamiento operante, basados en los estudios desarrollados por Skinner (1938) utilizando la comida como estímulo reforzante, el acceso al etanol se produce de forma contingente tras la realización de una respuesta específica (presionar una palanca) o una secuencia de respuestas (presionar cuatro veces la palanca). De esta manera, se puede determinar el fenómeno de la búsqueda de la droga (tasa de presión de la palanca o la latencia entre presiones) además de conocer el volumen de etanol consumido. La posibilidad de ambas medidas en este modelo es de especial utilidad cuando el consumo de una droga tiene efectos sensoriales o motores que interfieren directamente en la conducta de ingesta continua.

En este tipo de modelos, el investigador puede variar las condiciones en las que se consumirá la droga, de forma que podrá modificar la intensidad del trabajo que deberá realizar el animal para obtener el etanol, la frecuencia de obtención del etanol o cuanto etanol se administrará el animal cada vez que realice la tarea impuesta. Todas estas variables influyen enormemente en la tasa de respuesta así como en la ingesta de etanol (Meisch, 1977; Samson y Hodge, 1996).

En muchos experimentos con este modelo los animales tienen acceso a la droga durante un corto espacio de tiempo en el día en el que se intercalan fases de realización

de la tarea impuesta y fases de acceso al etanol. Los animales en esta situación normalmente muestran una tasa de respuestas alta al principio que va disminuyendo lentamente con el tiempo hasta llegar a su cese total a los 10-15 minutos.

Aunque en la mayoría de experimentos el consumo de etanol es por vía oral algunos estudios han utilizado otras vías como la administración directa en el estómago, la sangre o el cerebro a través de la implantación de catéteres (Deneau y cols., 1969; Gatto y cols., 1994; Smith y cols., 1976). La ventaja fundamental del uso de estas técnicas es que permite al investigador comprobar la motivación de los animales por la ingesta de etanol tras el consumo de la droga sin sensaciones organolépticas (sabor, olor, quemazón en la boca y la garganta) que complican la interpretación de los resultados. Además, la administración del etanol directamente en el cerebro ha permitido la localización de núcleos cerebrales específicos que regulan los efectos reforzantes del etanol.

Este modelo parece ser valido como modelo de comparación con los humanos puesto que los consumidores de etanol normalmente beben controlando la cantidad de bebida y su patrón de consumo. De toda maneras, este modelo tiene la desventaja de no poder conocer en que manera influyen los efectos motivacionales en la autoadministración. Las técnicas de autoadministración realzan de forma significativa el incremento del placer o rechazo, la disminución del estrés, ansiedad o los efectos del síndrome de abstinencia. Con el tiempo se ha podido demostrar que existen un buen número de variables no farmacológicas (sabor, palatabilidad, poder calórico del etanol) que influyen en la autoadministración. Considerando todos estos factores, es posible que las variaciones en la autoadministración estén más relacionadas con la sensibilidad a los efectos organolépticos del etanol que a la su propia farmacología.

En los últimos años algunos autores han introducido modificaciones importantes en este modelo manteniendo los principios básicos de la autoadministración de etanol por condicionamiento operante como son el modelo de la autoadministración de etanol con fases de abstinencia forzadas (ADE) o el modelo de la readquisición de la conducta.

### 1.1.3. Autoadministración de etanol con fases de abstinencia forzadas (ADE).

En 1999, [Spanagel y Höltter](#) desarrollaron un nuevo modelo para el estudio de la búsqueda compulsiva e incontrolada del etanol y de las características de consumo de los pacientes alcohólicos. El modelo consiste en la autoadministración de etanol con fases de abstinencia forzada. En este modelo, los animales tienen acceso a comida, agua y a tres soluciones de etanol (5%, 10% y 20%) en su propia jaula. Después de dos meses de consumo de etanol, este es retirado durante varios días antes de que se les vuelva a ofrecer a las distintas concentraciones antes mencionadas. Este procedimiento se repite mensualmente a lo largo de un año.

La presencia de nuevo de etanol en las cajas tras la abstinencia forzada provoca un incremento temporal muy considerable en la preferencia y el consumo de etanol. Este patrón de consumo se ha visto repetido en otros animales de experimentación como ratas, ratones, monos y en bebedores sociales ([Sinclair, 1971](#); [Burish y cols., 1981](#)). Pero, no solo existe esta preferencia y aumento de consumo de etanol, sino que los animales cambian incluso su patrón de consumo. De hecho, los animales no solo llegan a consumir grandes cantidades de aquella concentración de etanol mas elevada sino que lo hacen a horas no muy habituales durante el ciclo de luz cuando estos están más inactivos y su patrón de bebida es menor.

Con este método se consigue que los efectos de la privación se mantengan durante toda la abstinencia (ej. meses) demostrando que el animal recuerda que existe la droga. Esta persistencia es similar a la existente en humanos que pueden recaer después de años de abstinencia.

Estos efectos de la privación pueden también resultar patentes utilizando métodos de condicionamiento operante, es decir, que el animal esté obligado a realizar una conducta determinada para recibir el etanol. En este tipo de experimentos, tanto el consumo como la preferencia por el etanol se incrementaron considerablemente tras dos

semanas de abstinencia (Hölter y cols., 1997) demostrándose de esta manera que existe una marcada motivación por la droga. Esta motivación por la droga se ha podido demostrar igualmente introduciendo programas de razón progresiva en los que el animal debe trabajar cada vez mas para obtener el refuerzo (Spanagel y Hölter, 2000). Estos hallazgos demuestran que en tratamientos crónicos, los efectos de la privación aumentan la motivación para esforzarse en conseguir el etanol, lo que es compatible con la definición de la conducta de búsqueda de la droga (Markou y cols., 1993).

El aumento de motivación para la obtención del etanol no es el criterio principal para definir la adicción en los animales siendo necesario la demostración de la pérdida de control sobre su ingesta. Esto se ha llevado a cabo examinando la influencia de soluciones de quinina o soluciones dulces sobre los efectos producidos por la privación. Los resultados han demostrado que en animales expuestos a largos periodos de consumo de etanol, la ingesta posterior a la fase de abstinencia es bastante resistente a las modificaciones del sabor de las soluciones, en otras palabras, llegado el consumo de etanol a cierto punto la conducta de su ingesta es inflexible e incontrolada.

Toda la información hasta ahora obtenida con este método demuestra que el consumo de etanol no es solo debido a necesidades nutricionales sino que se debe al menos en parte a los efectos farmacológicos del etanol. Dicho de otra manera, el consumo de etanol durante los efectos de la privación parece incluir conductas de búsqueda e ingesta compulsivas e incontroladas que pueden diferenciarse claramente de las patrones normales de comida y bebida.

#### 1.1.4. Modelo de la readquisición de la conducta.

El principal criterio para conocer una dependencia por el etanol es la pérdida de control sobre su consumo. Tanto la búsqueda compulsiva como el consumo de etanol pueden producirse incluso tras largos periodos de abstinencia. Estos hechos, están normalmente asociados con la necesidad imperiosa del consumo y con las recaídas.



Basándonos en esta idea, el uso de modelos animales que analicen el fenómeno de la recaída puede permitirnos investigar aspectos de la dependencia en humanos que no son fácilmente analizables con los modelos animales preferentes. Un modelo que nos permite examinar las recaídas y la búsqueda compulsiva del consumo de etanol es el modelo de la readquisición de etanol ([Stewart y de Wit, 1987](#)).

En el modelo de la readquisición, el animal aprende a presionar una palanca para recibir etanol u otra droga. Tras el tiempo de aprendizaje, el etanol se retira aunque el animal presione la palanca, con lo que pasado un tiempo, el animal extingue esta conducta. Cuando la extinción de la conducta es total, se le presentan a los animales distintos estímulos para comprobar si el animal de nuevo presiona la palanca y se produce la readquisición de la conducta de presión aún sin presentar el etanol. Existen tres estímulos que se usan en este modelo para comprobar si el animal readquirirá la conducta, que son: 1) la inyección de una dosis pequeña de droga ([Chiamullera y cols., 1995](#); [Ludwig y cols., 1993](#)) que puede incluso ser eficaz tras años de abstinencia ([Besancon, 1993](#)), 2) el estrés ([Le y cols., 1998](#)) y 3) la presencia de un estímulo condicionado que se presentó con la liberación del etanol durante la fase de entrenamiento ([Katner y cols., 1999](#)).

Este método tiene dos limitaciones importantes como son la falta de seguridad de la dependencia alcohólica de los animales debido a que la ingesta del etanol no se controla a través de mecanismos de comportamiento normales o que la extinción de la conducta de búsqueda del etanol no desempeña un papel tan relevante en los pacientes alcohólicos que intentan llegar o mantenerse en estado de abstinencia. A excepción de los pacientes tratados con terapia de extinción, el resto tiende a evitar todo estímulo no condicionante asociado a la bebida (ej. olor del etanol, el paso delante del bar habitual donde se producía el consumo...). Por estas razones este método no refleja del todo la experiencia de los alcohólicos abstinentes con el deseo de consumo y las recaídas.

Por último es interesante señalar, que este modelo permite además de conocer los sustratos neurobiológicos de la conducta de búsqueda del etanol y las recaídas el estudiar los efectos de fármacos útiles para evitar ambas conductas anteriormente nombradas.

## **2. Modelos animales de condicionamiento.**

Tanto el aprendizaje como la memoria desempeñan un papel importante en los procesos apetitivos que contribuyen a la regulación del consumo de etanol, el fenómeno del deseo de consumir la droga o las recaídas. Estos modelos de condicionamiento están basados en la premisa de que los individuos pueden aprender a asociar el etanol con estímulos que predicen el consumo de la droga. Los modelos de condicionamiento más utilizados en el estudio del etanol son el condicionamiento preferencial al sitio y el condicionamiento preferencial al sabor.

### ***2.1. Modelo de condicionamiento preferencial al sitio.***

El condicionamiento preferencial al sitio es un modelo ampliamente utilizado por la comunidad científica para estudiar los efectos motivacionales de las drogas de abuso (Tszchentke, 1998).

En un típico experimento de conducta preferencial al sitio, los investigadores entrenan a los animales, en aparatos especialmente diseñados para ello, para recibir distintos estímulos visuales, auditivos, táctiles u olfatorios en distintas localizaciones espaciales. En la práctica, el aparato consta de dos habitáculos con distintas texturas en el suelo y con paredes de distintos colores. Normalmente, se entrena a los animales durante varias sesiones en las que se les sitúa en uno de los compartimentos cuando se les administra el etanol (siempre el mismo) y en el otro en ausencia de la droga. Cuando se lleva a cabo el experimento se coloca al animal en el aparato dejando que se mueva

libremente y elija el lugar de mayor permanencia. Si se encuentra más tiempo en el habitáculo asociado con la administración de etanol se considera que esta conducta refleja los efectos motivacionales positivos del etanol, si por el contrario pasa más tiempo en el habitáculo no asociado al etanol, esto reflejaría los efectos motivacionales negativos de la droga.

La capacidad del etanol para producir el condicionamiento preferencial al sitio depende de un amplio número de variables como la especie y raza de los animales utilizados, la dosis y la ruta de administración del etanol y la toma de contacto previa con la droga. Como ejemplo, podemos citar las diferencias entre ratas y ratones con respecto a su sensibilidad frente a los efectos reforzantes del etanol ([Cunningham y cols., 1993](#)). Aunque la mayoría de estudios realizados con ratas han demostrado la existencia de condicionamiento preferencial al sitio aversivo asociada al etanol ([Sherman y cols., 1988](#)), el condicionamiento preferencial al sitio asociado a la administración de etanol se ha comprobado en algunas razas de ratones ([Cunningham y cols., 1991; 1992](#)). Por encima de otras consideraciones, estos hallazgos sugieren que ratas y ratones son distintos en su sensibilidad a los efectos motivacionales positivos y negativos del etanol.

Desde el momento en que se comenzó a utilizar el modelo con ratones ha ido creciendo el interés por utilizarlo para el estudio de los mecanismos genéticos y neurobiológicos que subyacen en los efectos reforzantes del etanol. A partir de los primeros estudios que demostraban los efectos de los antagonistas opiáceos en la autoadministración de etanol (reducción del consumo), los últimos resultados utilizando estos fármacos en el condicionamiento preferencial al sitio han demostrado que su administración reduce el tiempo de permanencia del animal en el habitáculo asociado a la administración de etanol ([Cunningham y cols., 1998](#)). Este resultado permite sugerir la posibilidad de que los estímulos ambientales asociados al consumo de etanol modifiquen la actividad de los péptidos opioides endógenos.

## ***2.2. Modelo de condicionamiento preferencial al sabor.***

En los estudios de condicionamiento al sabor, el efecto de la droga se asocia a la ingestión de comida o bebida con sabor nuevo y diferente al habitual. La mayoría de las veces la droga se administra inyectada aunque puede asociarse directamente al sabor de la comida o bebida. Los efectos de la asociación droga-sabor se evalúan midiendo la preferencia o ingesta por el sabor sin la presencia de la droga. Presumiblemente, las drogas que produzcan efectos motivacionales positivos deberían incrementar la preferencia o ingesta de la sustancia con sabor y las que produzcan efectos motivacionales negativos disminuirán este consumo o su preferencia.

Tanto en ratas como en ratones se ha podido desarrollar el condicionamiento aversivo de las soluciones asociadas entre cantidades moderadas/altas de etanol y como en otros modelos anteriormente comentados se han encontrado diferencias genéticas y en los mecanismos neurobiológicos que regulan los efectos aversivos del etanol entre sujetos de una misma especie. Así, podemos decir que el modelo de condicionamiento al sabor también contribuye a la investigación sobre los genes involucrados en los efectos motivacionales del etanol ([Risinger y Cunningham, 1998](#)) y a la identificación de los neurotransmisores que participan en el proceso ([Risinger y cols., 1999](#); [Sklar y Amit, 1977](#)).

### **3. Modelos genéticos**

#### ***3.1. Modelos transgénicos.***

Dentro de los modelos de ratones, el término transgénico se refiere a la introducción de un gen extraño (transgén) dentro del material genético de un ratón tanto en las células reproductoras como en las no reproductoras. Esto provoca la expresión y la propagación de este gen a las generaciones futuras. Esta técnica permite a los científicos evaluar el papel de genes específicos en el desarrollo de una enfermedad.

Los ratones transgénicos se han utilizado tradicionalmente para estudiar el desarrollo de procesos y como modelos de enfermedades. Aunque se han desarrollado varias líneas de transgénicos su uso ha sido muy limitado en el alcoholismo. A pesar de esto, este modelo continúa siendo útil para la identificación de genes que regulan ciertos aspectos del alcoholismo (Wehner y Bowers, 1995).

Los ratones transgénicos se utilizaron en el consumo de etanol (Engel y cols., 1998) y en la sensibilidad inicial al etanol (Engel y Allan, 1999). Los resultados de estos estudios demostraron que la sobre expresión de los receptores 5-HT<sub>3</sub> disminuían el consumo de etanol en un 46% (mayor disminución a mayor sobre-expresión del receptor en las líneas) y aumentaban la sensibilidad a los efectos de dosis pequeñas de etanol.

Existe un buen número de estudios demostrando que los efectos de las administraciones aguda o crónica de etanol modifican funcionalmente distintas subunidades del receptor del GABA (Grobin y cols., 1998). La subunidad  $\gamma 2$  ( $\gamma 2L$  o  $\gamma 2S$ ) ha sido estudiada en relación con su papel en la sensibilidad por el etanol.

Las líneas de transgénicos de 5-HT<sub>3</sub> y  $\gamma 2L$  y  $\gamma 2S$  son ejemplos del uso de esta tecnología en la investigación del etanol con los objetivos de estudiar la sensibilidad inicial, la tolerancia o el consumo de etanol. Existen otras líneas de ratones transgénicos que se han usado para otro tipo de estudios relacionados con el consumo de etanol como su

papel en las agresiones, como cofactor en la infección del VIH, sus efectos en la cardiomiopatía alcohólica, ratones transgénicos para la alcohol deshidrogenasa, la neurotoxicidad cerebelosa en neonatos inducida por el etanol.

### ***3.2. Modelos animales desprovistos de genes o con genes mutados.***

Los ratones desprovistos de genes o con genes mutados se crean por la eliminación de un determinado gen o por su mutación respectivamente. Idealmente, algunas de las diferencias observadas en el fenotipo del transgénico pueden deberse a la ausencia del gen o a su alteración. Sin embargo, las adaptaciones que pueden deberse durante el desarrollo a la mutación originada y la expresión del genotipo propio del animal pueden también ocasionar cambios en la conducta que no son necesariamente debidos a la pérdida o la mutación del gen.

Los genes seleccionados con mayor frecuencia para las modificaciones genéticas son aquellos que codifican proteínas receptoriales. De hecho, ya se han utilizado varias líneas de ratones desprovistos de genes que han permitido conocer la contribución de subunidades específicas de un receptor en los efectos farmacológicos conductuales del etanol (sedación, sensibilidad al etanol, ataxia, síndrome de abstinencia, tolerancia o consumo). Se han creado cuatro líneas de ratones a las que les falta alguna de las subunidades  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2L$  o  $\delta$  del receptor del GABA<sub>A</sub> para determinar su grado de implicación en las respuestas al etanol y los anestésicos (Bowers y cols., 2000b; Mihalek y cols., 1999; Homanics y cols., 1997, 1998, 1999; Quinlan y cols., 1998). Los resultados obtenidos hasta el momento han demostrado que la falta de cualquiera de las subunidades  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2L$  no supone variación alguna en la sedación, la tolerancia o el síndrome de abstinencia inducidos por el consumo de etanol (Homanics y cols., 1997, 1998, 1999; Quinlan y cols., 1998). La implicación de la subunidad  $\delta$  en el consumo de etanol también ha sido estudiada utilizando el método preferencial de consumo de etanol. En este estudio se pudo comprobar como en aquellos animales en los que se había eliminado el gen correspondiente a la subunidad  $\delta$ , se producía un consumo

significativamente menor (Bowers y cols., 2000b) demostrándose de esta manera que esta subunidad es importante en la preferencia por el consumo de etanol.

Tanto el sistema dopaminérgico como el serotoninérgico están implicados en la hiperactividad motora como en los efectos reforzantes producidos por el etanol, de manera que, algunos de los genes que codifican para las proteínas receptoriales de estos sistemas de neurotransmisión han sido también utilizadas para la creación de animales desprovistos de genes. Los animales desprovistos de gen para el receptor dopaminérgico  $D_2$  se crearon basándose en la implicación de las distintas variantes del receptor dopaminérgico  $D_2$  en el alcoholismo aunque esta afirmación no haya sido encontrada en todos los estudios (Goldman, 1995). Cuando se compararon ratones mutados con ratones no mutados en su preferencia por el etanol frente al agua se encontró que en aquellos mutados se producía una clara disminución del consumo de etanol (Phillips y cols., 1998). Estudios parecidos se han llevado a cabo con animales desprovistos del gen para el receptor  $D_1$  y también se produjo una disminución del consumo de etanol que podría estar asociada a niveles elevados de dopamina en ciertas regiones cerebrales (El-Ghundi y cols., 1998).

Contrariamente a lo que ocurre con los animales desprovistos de genes para los receptores dopaminérgicos, los estudios iniciales con animales carentes del gen para el receptor serotoninérgico  $5-HT_{1b}$  se duplicó el consumo de etanol en comparación con los animales naturales (Crabbe y cols., 1996). Otros estudios utilizando estos mismos ratones genéticamente modificados también han puesto de manifiesto el aumento de sensibilidad a la ataxia producida por etanol y el retraso en la aparición de tolerancia tras un consumo crónico de etanol.

En la investigación sobre el etanol con animales transgénicos también se han manipulado enzimas denominadas proteín-quinasas. Las proteín-quinasas son enzimas que activan o desactivan la función de la proteína, por medio de la fosforilación de ciertos grupos de la molécula. La activación o desactivación de proteínas específicas son

dos componentes del mecanismo de señalización a través del cual las señales químicas del exterior de la célula pasan al interior.

Hasta la fecha, la función de la proteína-quinasa C (PKC) se ha relacionado con los efectos del etanol sobre el cerebro (Stubbs y Slater, 1999) y de hecho se han utilizado dos líneas de ratones carentes en los genes PKC $\gamma$  y PKC $\epsilon$  para estudiar su influencia sobre el comportamiento inducido por el etanol. Los estudios de sensibilidad a la sedación producida por el etanol y el desarrollo rápido de tolerancia han demostrado ser menores en aquellos animales carentes del gen PKC $\gamma$  (Harris y cols., 1995b; Bowers y cols., 1999, 2000a) frente aquellos no mutados. Los estudios realizados con ayuda de los animales carentes del gen de PKC $\epsilon$  muestran mayor sensibilidad a la sedación del etanol puesto que su consumo es 200 veces mayor con respecto a los animales no mutados (Hodge y cols., 1999).

A parte de los estudios de sensibilidad llevados a cabo en animales carentes en genes de la familia de la PKC también existen otros modelos animales utilizados como los ratones desprovistos de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (Weinshenker y cols., 2000), los carentes del gen de la subunidad  $\beta$ II de la proteína quinasa A (Thiele y cols., 2000), los desprovistos del gen de la tirosín-quinasa Fyn (Miyakawa y cols., 1997) o ratones carentes del gen de la aldehído deshidrogenasa (Deltour y cols., 1999).

A partir de estas investigaciones utilizando los animales transgénicos y en los que se ha eliminado determinados genes se puede apreciar la complejidad de los efectos del etanol y la dificultad de medir la contribución de cada una de las proteínas manipuladas en el alcoholismo.



## ***La Terapéutica del Alcoholismo***

### **1. El síndrome de abstinencia alcohólico.**

El síndrome de abstinencia alcohólico consiste en síntomas físicos y mentales displicentes tras el cese del consumo de etanol. Estos síntomas van desde temblores leves a las alucinaciones y las convulsiones. Los episodios de abstinencia repetidos pueden contribuir al desarrollo de la dependencia alcohólica y a las consecuencias negativas sobre la salud del alcoholismo.

Los síntomas de la abstinencia representan una fase dentro del ciclo provocado por el etanol, de inhibición y excitación neuronal. Las investigaciones han demostrado que la

administración aguda de etanol altera la liberación de neurotransmisores en las neuronas que puede alterar las funciones de las proteínas en las membranas neuronales y de los flujos de iones a través de los canales iónicos. Cuando se repite el consumo de etanol, el cerebro intenta volver a su funcionamiento normal a través de adaptaciones (tolerancia) que reducen las perturbaciones iniciales inducidas por el alcohol. El consumo crónico de etanol provoca la dependencia física y las adaptaciones ocurridas son tan importantes que el cerebro necesita la presencia constante de etanol para funcionar con normalidad. Cuando un consumidor habitual deja el etanol las adaptaciones inhibitorias que ocurren inicialmente por el consumo de etanol quedan desequilibradas ocasionando un rebote de hiperexcitabilidad o síndrome de abstinencia.

El síndrome de abstinencia está caracterizado por síntomas de hiperactividad del sistema nervioso autónomo (Schuckit y cols., 1995; Yost, 1996). Los síntomas iniciales son relativamente leves e incluyen ansiedad, insomnio y temblores. Estos síntomas comienzan entre 3 a 6 h después de dejar de beber, antes de que la alcoholemia llegue a cero y terminan entre las 24-72 h siguientes. También pueden producirse convulsiones severas dentro de los 2 días siguientes al cese del consumo en el 5-10% de pacientes (Victor y Adams, 1953; Schuckit y cols., 1995; Yost, 1996).

Tomando en consideración los datos clínicos aproximadamente el 10% de los alcohólicos pueden desarrollar algunos síntomas adicionales. Estos son una combinación de síntomas de hiperexcitación como incrementos en la presión arterial, el pulso, la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardíaca y el aumento de temperatura corporal. La sudoración profusa puede incluso deshidratar al individuo y el temblor puede llegar a ser tan pronunciado como para impedir el manejo de los cubiertos. Estos síntomas aparecen el 3º-4º día de abstinencia y suelen mejorara en el 5º (Schuckit y cols., 1995).

A menudo el síndrome de abstinencia alcohólico se complica en sus últimas etapas por la presencia del *delirium tremens*. El *delirium tremens* puede presentarse incluso hasta las 96 h después de cesar en el consumo de etanol (Victor y Adams, 1953). Suele producirse

en pacientes que ingresan en el hospital por algún cuadro relacionado con su hábito (traumatismo, infección, etc.), desarrollando durante su estancia el delirium, que consiste en alucinaciones, temblores, convulsiones, insomnio, fiebre, taquicardia, sudoración, etc. En la mayoría de los casos su evolución es benigna resolviéndose espontáneamente en menos de tres días. Pero en un porcentaje inferior al 20%, la evolución conduce a la muerte del sujeto por causas que aún son desconocidas. El tratamiento de este cuadro requiere mantener un adecuado equilibrio electrolítico y de fluidos, permanencia y monitorización en UCI, administración de magnesio a demanda, investigación de enfermedades subyacentes, (hiper/hipotermia, hipoglucemia, desequilibrio electrolítico, pancreatitis, déficit de tiamina, cetoacidosis alcohólica, sangrado gastrointestinal, traumatismo cerebral. ..), administración de diazepam en dosis de hasta 90 mg, vigilar la aparición de encefalopatía hepática, tratar las alucinaciones con 2-4 g de haloperidol intra-muscular, administración de tiamina y piridoxina.

### ***1.1. Neurotransmisores en el síndrome de abstinencia.***

#### **1.1.1. Complejo del receptor GABA<sub>A</sub>.**

El aminoácido ácido gamma amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. El mecanismo de acción del GABA es la unión de este a un lugar de unión en el receptor GABA<sub>A</sub> que causa la apertura del canal de Cl<sup>-</sup> asociado al receptor que permite el paso a su través del ión al interior de la célula. El flujo de estos iones negativos al interior de la célula provoca una disminución de su sensibilidad para continuar el proceso de neurotransmisión. El receptor GABA<sub>A</sub> junto a algunos otros sitios de unión para otras moléculas (benzodiazepinas, alcohol, barbitúricos,...) y el canal iónico de Cl<sup>-</sup>, forma un complejo de 5 subunidades proteicas (Morrow, 1995; Buck, 1996).

Estudios en ratones, ratas y cultivos neuronales han demostrado que la exposición crónica al etanol altera la actividad de genes directamente implicados en la síntesis de las subunidades proteicas del receptor GABA<sub>A</sub> aumentando unas y disminuyendo otras (α1)

(Beattie y Siegel, 1993; Homanics y cols., 1998; Li y cols., 1993). Criswell y cols. (1995) hipotetizaron que las proteínas del receptor GABA<sub>A</sub> que tenían subunidad  $\alpha 1$  son más susceptibles a los efectos agudos del etanol. Además, reduciendo el número de receptores con la subunidad  $\alpha 1$  las neuronas respondían menos a los efectos de la droga, siendo este un cambio que puede representar un mecanismo potencial en la adaptación del sistema gabérgico. Aunque la mayoría de investigadores consideran esta alteración del receptor GABA<sub>A</sub> implicada en el desarrollo de tolerancia, no está claro si desempeña un papel importante en la abstinencia de etanol. Esto supone la reducción de la actividad del GABA sobre su propio receptor aunque esta hipótesis mantiene dividida a la comunidad científica (Whittington y cols., 1995; Kang y cols., 1996). A pesar de estas discrepancias, las alteraciones en los receptor GABA<sub>A</sub> son una causa posible de varios síntomas en el síndrome de abstinencia alcohólico como la ansiedad y los ataques.

Varias sustancias que se unen a los receptores gabérgicos reducen la abstinencia a etanol como las benzodiacepinas y algunos esteroides (Solomon y cols., 1983; Saitz y cols., 1983; Hoey y cols., 1984; Nie y Janak, 2003). Los efectos anticonvulsivantes de estas sustancias se evidencian en las reducciones de la sensibilidad a las convulsiones inducidas químicamente. Dependiendo de los ligandos, los experimentos han demostrado la aparición de tolerancia así como de sensibilización a los efectos anticonvulsivantes de éstos durante la abstinencia (Karst y cols., 1999; Roberts y Keith, 1995; Schridde y Van Lijstelaar, 2004; Kokate y cols., 1993, 1994).

Aunque los efectos iniciales del etanol son inhibitorios, el consumo crónico disminuye la capacidad que tienen el GABA, las benzodiacepinas y los barbitúricos para inducir estos efectos inhibitorios de los receptores GABA<sub>A</sub> en animales dependientes del etanol (Morrow, 1995; Buck, 1996). Además, la administración crónica de etanol disminuye el transporte de Cl<sup>-</sup> inducido por muscimol (agonista del receptor gabérgico A) y reduce el aumento del transporte de Cl<sup>-</sup> previamente estimulado por muscimol debido a benzodiacepinas o barbitúricos (Buck y Harris, 1990; Morrow y cols., 1988). Esta reducida

efectividad de las benzodiazepinas sobre el transporte activado por muscimol se comporta de manera inversa durante la abstinencia (Buck y cols., 1991).

Estos cambios en las subunidades del receptor reflejan una alteración en el ensamblaje final del receptor lo que podría explicar parte de las adaptaciones comportamentales y celulares en la dependencia y abstinencia al etanol.

#### 1.1.2. Agonistas esteroideos del receptor GABA<sub>A</sub>.

La alopregmolona, producto del metabolismo de progesterona, es el modulador esteroideo más potente de la actividad del receptor GABA<sub>A</sub> (Maitra y Reynolds, 1998; Hiemke y cols., 1991). La alopregmolona se encuentra en el cerebro y el torrente sanguíneo y parece que se sintetiza en las glándulas adrenales en los hombres y los ovarios en las mujeres aunque parece existir cierto nivel de síntesis en el cerebro. La alopregmolona se une al receptor gabérgico GABA<sub>A</sub> en lugar distinto a las benzodiazepinas, los barbitúricos y el GABA y como agonista GABA que es, sus efectos son inhibitorios y su unión al receptor suprime el desarrollo de convulsiones. La administración crónica de alcohol produce un aumento de la respuesta anticonvulsivante (sensibilización) de la alopregmolona. Además, existe un aumento del 42% en el transporte de Cl<sup>-</sup> inducido por el esteroide cuando el receptor es activado por GABA en ratas abstinentes en comparación con ratas no abstinentes (Devaud y cols., 1996). Se han encontrado resultados similares con otros agonistas del receptor GABA<sub>A</sub> como la tetrahydrodeoxicorticosterona (Devaud y cols., 1996). Este aumento en la acción de los agonistas esteroideos durante la abstinencia alcohólica contrasta con la reducida eficacia del GABA, benzodiazepinas y barbitúricos pero lo más importante es, la modulación diferencial de los lugares de acción de benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides neuroactivos en el desarrollo de la dependencia alcohólica.

Debido a que la alopregmolona es un potente modulador de los receptores GABA<sub>A</sub> y que puede alcanzar niveles fisiológicos activos en cerebro y plasma (Paul y Purdy, 1992) es muy posible que los cambios en su sensibilidad o en su síntesis pudieran modular la

severidad del síndrome de abstinencia. De hecho, en un estudio con humanos se encontró una disminución de alopregnenolona y tetrahydrodeoxicorticosterona en sujetos alcohólicos durante las primeras fases de abstinencia (Romeo y cols., 1996). En consonancia con estos resultados y de acuerdo con la hipótesis anteriormente expuesta es posible sugerir que la disminución de esteroides neuroactivos durante la abstinencia puede estar relacionada con el aumento de la ansiedad y la depresión en alcohólicos.

El alcoholismo crónico también incrementa los niveles plasmáticos de corticosterona en animales de experimentación. La corticosterona, hormona esteroidea sintetizada por las glándulas adrenales, desempeña un papel fundamental en la respuesta corporal al estrés y puede aumentar la sensibilidad en el desarrollo de las convulsiones (Karst y cols., 1999; Roberts y Keith, 1995; Schridde y Van Luijtelaar, 2004). De cualquier forma, el incremento plasmático de la corticosterona y la disminución de la alopregnenolona tras la exposición crónica de etanol sugieren que la síntesis biológica de ambos esteroides se regula de forma distinta. Este hecho está de acuerdo con la hipótesis de que las diferencias genéticas en la severidad del síndrome de abstinencia se modulan tanto por los esteroides convulsivos (corticosterona) como por los anticonvulsivos (alopregnenolona), los cuales tienen diferentes mecanismos de acción (Karst y cols., 1999; Roberts y Keith, 1995; Schridde y Van Luijtelaar, 2004; Kokate y cols., 1993, 1994).

#### 1.1.3. Complejo del receptor NMDA.

Se han podido comprobar alteraciones en los receptores de los aminoácidos excitatorios (sobre todo en el receptor NMDA) tras la exposición crónica a alcohol (Crews y cols., 1996; Tabakoff y Hoffman, 1996). El receptor glutamatérgico NMDA, que regula el canal iónico de calcio y sodio, tiene un papel fundamental en la memoria, el aprendizaje y la generación de temblores y en la abstinencia inicial se ha relacionado también con la ataxia, la ansiedad y las convulsiones (Gulya y cols., 1991). En los últimos años, los investigadores han trabajado en la implicación del receptor NMDA utilizando el antagonista glutamatérgico MK-801 en el consumo crónico y la abstinencia. Los resultados con MK-801

han mostrado un aumento en los lugares de unión del glutamato y aunque estos datos no son concluyentes, las evidencias sugieren que el consumo crónico de etanol aumenta el número de receptores de NMDA en el hipocampo y la corteza cerebral (Gulya y cols., 1991; Samson y Harris, 1992) además de una reducción de la fase de abstinencia. El curso temporal del aumento de los sitios de unión se correlaciona con el establecimiento y el pico máximo del periodo de abstinencia (alrededor de las 8 horas) pero va desapareciendo según lo hacen aparentemente los síntomas de abstinencia (después de 24 horas).

Los estudios en los que se investigó la severidad de la abstinencia utilizando ratones WSP y WSR no son del todo concluyentes. Inicialmente se consideró que la unión a MK-801 era mayor en los ratones WSP no expuestos a etanol en el hipocampo comparándolos con ratones WSR (Valverius y cols., 1990). La administración crónica de etanol utilizando la dieta líquida de Lieber incrementó significativamente los sitios de unión en ambas líneas de ratones manteniéndose más elevados en los ratones WSP (Crabbe y cols., 1990). Sin embargo, tras la exposición de 24 h de vapores de etanol, la unión del MK-801 no varió en ratones WSP mientras que se veían síntomas de abstinencia tras la retirada del etanol. (Carter y cols., 1995).

La producción y transporte de receptores NMDA hasta la membrana necesita varios días para completarse, un tiempo que se correlaciona con el desarrollo de tolerancia y la posible aparición de una abstinencia posterior a la retirada del etanol (Engberg y Hajos, 1992; Hoffman y Tabakoff, 1994; Tremwell y cols., 1994; Rudolph y cols., 1997). El aumento en el número de receptores persiste durante bastante tiempo después de la retirada del etanol contribuyendo a la aparición de distintas manifestaciones del síndrome de abstinencia alcohólico como los ataques y las alucinaciones (Grant y cols., 1990; Hoffman y Tabakoff, 1994).

#### 1.1.4. Canales voltaje-dependientes de calcio

Experimentos llevados a cabo con antagonistas de los canales de calcio (dihidropiridinas) han demostrado la implicación de estos canales en la hiperexcitabilidad durante el síndrome de abstinencia (Little, 1991). Por ejemplo, la administración crónica de etanol, aumenta en un 50% los sitios de unión de las dihidropiridinas lo que puede producir grados leves de abstinencia sin convulsiones espontáneas. Además, el aumento en los sitios de unión observado tras 3-4 días de administración de etanol se modula a través del transporte de calcio al interior de la neurona (Little, 1991).

La presencia continua de etanol aumenta el número de canales de calcio mostrando de esta manera un mecanismo adaptativo que compense los efectos inhibitorios del etanol. Este aumento probablemente sea debido a un aumento de su expresión génica (Littleton y Little, 1994) que sigue un curso temporal muy parecido al aumento en el número de receptores de NMDA durante el desarrollo de tolerancia y al abstinencia.

Se han llevado a cabo estudios en los que la administración de dihidropiridinas han reducido la hiperexcitabilidad del síndrome de abstinencia en el hipocampo producida por la retirada del etanol tras la administración crónica de la droga (Whittington y cols., 1992; Whittington y Little, 1991; Bailey y cols., 1998). Además la administración de nitrendipino y nimodipino redujeron las convulsiones espontáneas e inducidas por el síndrome de abstinencia a dosis con escasos efectos sedantes (File y cols., Whittington y cols., 1991; Watson y cols., 1994). La administración de dihidropiridinas durante el consumo crónico de etanol previno la regulación al alza de los sitios de unión para éstas moléculas en el cerebro y disminuyeron la severidad del síndrome de abstinencia (File y cols., 1989, 1992).

Tomando en consideración estos datos, podemos decir que la adaptación de los canales de calcio es uno de los mecanismos que participa en el desarrollo de la tolerancia y la abstinencia alcohólica (Samson y Harris, 1992; Littleton y Little, 1994).



## **2. Tratamiento del alcoholismo.**

El tratamiento de la dependencia al etanol comienza con una primera fase de **desintoxicación**, que consiste en la supresión brusca y programada del consumo de etanol y el empleo de estrategias y fármacos para hacer lo más cómoda posible para el paciente la supresión del etanol, y evitar las complicaciones, potencialmente graves, inherentes a la abstinencia. Después, comienza el periodo de **deshabitación**, dirigido a la prevención de recaídas en el consumo, mediante el abordaje multimodal de las características del paciente, tanto de índole psicosocial como de presumible índole fisiológica, que suponen para cada caso una especial vulnerabilidad y un riesgo de recaer en la ingesta de etanol.

El tratamiento de desintoxicación debe seguirse, sin solución de continuidad, de un abordaje para la rehabilitación y prevención de las recaídas, al tiempo que se van tratando el resto de problemas asociados. Por ello, se hace preciso evaluar las características que indiquen la necesidad de un abordaje especializado para la deshabitación, indicar la derivación, si procede, lo antes posible, y elegir los fármacos para la desintoxicación en función de los antecedentes del pacientes y las complicaciones previsibles a corto y medio plazo.

### ***2.1. Tratamiento farmacológico del síndrome de abstinencia por etanol.***

En la actualidad se dispone de un importante arsenal de fármacos con utilidad para el proceso de desintoxicación, con distintas propiedades y perfiles farmacológicos, que hacen posible individualizar planes de tratamiento en función de las características de cada paciente.

El fundamento del tratamiento de desintoxicación es hacer lo más confortable para el paciente el proceso de supresión del consumo de etanol y prevenir las complicaciones asociadas al síndrome de abstinencia. Básicamente, se trata de utilizar

fármacos de acción sedante que contrarrestan la hiperexcitabilidad asociada a la abstinencia (benzodiacepinas, neurolépticos, anticonvulsivantes y otros).

Existen tres tipos de estrategias en el manejo del síndrome de abstinencia: a) establecer una pauta de sedación fija según la gravedad del síndrome de abstinencia; b) iniciar el tratamiento a dosis altas para mantener al paciente lo más sedado posible y reducir paulatinamente la dosis y c) administrar la dosis según vayan apareciendo los síntomas. Las dos primeras estrategias suelen emplearse más en los servicios de urgencias. La pauta de sedación fija constituye una forma habitual de tratamiento del síndrome de abstinencia y con esta estrategia lo que se consigue es disminuir las complicaciones del síndrome de abstinencia, aunque puede producirse una sobredosificación.

#### 2.1.1. Clometiazol.

El clometiazol es un derivado de la vitamina B<sub>1</sub> muy eficaz debido a su gran especificidad de acción ([Lundqvist, 1996](#)). Es de elección cuando se prevé o existe ya agitación psicomotora y en el ámbito hospitalario puede utilizarse por vía intravenosa con control estrecho, consiguiéndose de este modo una rápida sedación. En el medio ambulatorio se utiliza de forma oral. Entre las características relevantes para su uso, destacan la importante acción sedante, hipnótica y anticonvulsivante, la acción depresora central, por lo que debe evitarse su uso concomitante con otros sedantes, si existe riesgo de que se consuma etanol durante el tratamiento y si existe insuficiencia respiratoria o cardiopatía. Posee gran potencial adictivo, aparece rápidamente tolerancia a sus efectos y si no hay control, los pacientes inician una rápida escalada de la dosificación tras un tiempo prolongado.

#### 2.1.2. Tetrabamato.

El tetrabamato es un sedante suave con menos contraindicaciones y por tanto más útil en el tratamiento ambulatorio. Probablemente sea menos eficaz para evitar complicaciones comiciales. El tetrabamato no es hipnótico ni potencia los efectos del

etanol, no es depresor respiratorio y no afecta las tareas que requieren coordinación psicomotora, por lo que se puede emplear en pacientes que se mantienen activos. Además, el tetrabamato carece de potencial adictivo y no es hepatotóxico.

#### 2.1.3. Tiapride.

El Tiapride es un neuroléptico de la familia de las benzamidas. Sin embargo, su potencia antipsicótica es muy débil en comparación con los neurolépticos clásicos aunque sí tiene efecto antialucinatorio en el *delirium* (Peters y Faulds, 1994). Tiene escaso efecto hipnótico, no produce depresión respiratoria, no potencia los efectos del etanol, tiene efectos antialucinatorio y antitremórico. No tiene potencial adictivo y es escasamente hepatotóxico. Debido a estas características, es un fármaco de gran utilidad en pacientes con dependencia leve o moderada, con riesgo de hipoventilación, sin riesgo de comicialidad y también cuando haya dudas respecto al cumplimiento estricto de la abstinencia o tendencias adictivas.

#### 2.1.4. Benzodiacepinas.

Es el grupo de fármacos que más se han utilizado en la desintoxicación, sobre todo en Estados Unidos, pues en Europa su uso se comparte con los fármacos descritos anteriormente ya que poseen menos complicaciones potenciales (Williams y McBride, 1998). Sin embargo, su eficacia es muy alta, pues controlan todos los síntomas y riesgos de la abstinencia, con una ventana terapéutica amplia. El riesgo de depresión central y la adictividad son las principales complicaciones, que aconsejan limitar su uso ambulatorio a aquellos casos en los que no hay patología física, la gravedad es leve o moderada. Las características principales de las benzodiacepinas son su potente efecto sedante e hipnótico, el hacer posible el control y prevención de patología comicial, la generación de depresión respiratoria, especialmente intensa y grave si se mezcla con etanol y un elevado potencial adictivo, con sintomatología de rebote tras la suspensión. Las

benzodiacepinas sufren metabolismo hepático con lo que pueden acumularse en caso de insuficiencia hepática exceptuando para loracepam y oxacepam.

El **Clordiacepóxido** es una benzodiacepina de vida media larga de características similares al diacepam. Se utiliza a dosis de 50-100 mg cada dos horas hasta la sedación del paciente el primer día, para reducir posteriormente en forma similar a lo descrito para diacepam. El **Cloracepato dipotásico** es otra benzodiacepina de vida media larga. Aunque se le supone un menor potencial adictivo, al no presentar en su farmacocinética un rápido e intenso pico plasmático, lo cierto es que en su presentación de 50 mg ha sido objeto de abuso por población adicta a drogas y también en pacientes con patología ansiosa, debido a su elevada potencia. Se utiliza en forma similar a las benzodiacepinas ya descritas, en un amplio rango de dosis entre 15 y 200 mg/día p.o. el primer día. El **Loracepam** es una benzodiacepina de vida media intermedia que se metaboliza en el hígado directamente por conjugación, por lo que no se acumula en caso de hepatopatía, siendo la benzodiacepina de elección en estos casos ([Peppers, 1996](#)). Presenta una cinética en meseta, sin pico plasmático, pero con una reducción brusca del efecto a las pocas horas. Además, produce rápidamente tolerancia, con lo que se acorta el tiempo de acción, y su uso se ha asociado a la aparición de crisis convulsivas tardías. Por todo ello, también se aconseja no prolongar demasiado tiempo su uso. Se utilizan dosis entre 3 y 15 mg/día, según se considere necesario para lograr una adecuada ansiólisis o sedación del paciente.

#### 2.1.5. Otros fármacos.

La **carbamacepina** es un anticonvulsivante utilizado también en patología afectiva, sobre todo bipolar. Es moderadamente sedante y previene y trata la patología comicial. Sin embargo, es poco utilizada en desintoxicación de etanol por su potencial hepatotóxico y mielotóxico, dada la existencia de suficientes alternativas de probada eficacia ([Casariego, 1990](#)). Determinados antihipertensivos, como el **atenolol** y la **clonidina** pueden ser utilizados como coadyuvantes para tratar los síntomas secundarios

a la hiperactividad noradrenérgica. Sin embargo, sólo consiguen un efecto parcial, no previenen las convulsiones y tienen escasa utilidad si se usan solos.

## ***2.2. Tratamiento coadyuvante del síndrome de abstinencia por etanol.***

Los pacientes alcohólicos de larga evolución suelen presentar algún tipo de desnutrición acompañada de deficiencias vitamínicas y minerales. La mayor parte de estas deficiencias se recuperan con una dieta equilibrada, pero en otras habrá que aportarlas por vía oral o intramuscular.

En los pacientes con dependencia por el etanol de larga evolución, con signos de desnutrición y sintomatología de probable relación con neuropatía se deben añadir **complejos vitamínicos B** (Cook, Hallwood y Thomson, 1998) En estos casos, la absorción en el tubo digestivo está disminuida, por lo que se debe utilizar de entrada la vía parenteral sobre todo para la administración de vitamina B1. Se pueden administrar 100-300 mg/día de tiamina por vía intramuscular para pasar a continuación a un complejo oral que suministre también ácido nicotínico y vitaminas B6 y B12. Los niveles de ácido fólico suelen estar bajos por disminución de la ingesta. Se recomienda una dieta rica en ácido fólico o administración de 4-5 mg/día, siempre con la precaución de asociar vitamina B12, pues el ácido fólico aumenta los requerimientos de cianocobalamina y puede empeorar los síntomas neurológicos.

El primer día de tratamiento el paciente puede presentar anorexia y náuseas, y no es recomendable forzar la ingesta de sólidos, aunque sí una moderada hidratación sobre todo con líquidos que aporten sales, como zumos de frutas. Se aconsejará la hiperhidratación oral en caso de sudación profusa, vómitos o fiebre, teniendo en cuenta que el exceso hídrico puede desencadenar un edema cerebral. Es importante una dieta rica en sales minerales, sobre todo magnesio (Feinman y Lieber, 1992). La administración de magnesio sigue siendo controvertida aunque suele recomendarse 1 mg/6 horas por vía

intramuscular durante los primeros dos días si existe historia de convulsiones o si los niveles en suero son inferiores a 1,5 mg %.

### ***2.3. Fármacos para la prevención de recaídas.***

La fase de deshabituación suele realizarse en nivel especializado y consiste en tratamientos multimodales enfocados a la rehabilitación y la prevención de recaídas. El riesgo de no derivar al paciente tratándolo de forma incompleta desde Atención Primaria, hace que el problema del etanol se centre en las alteraciones físicas y predispone al paciente a no realizar otros tratamientos. Sin embargo, los médicos de Atención Primaria tienen un papel fundamental en el proceso de deshabituación, reforzándolo, controlando los fármacos y coordinando la actividad de distintos especialistas evitando instrucciones contradictorias con el psiquiatra, detectando posibles recaídas, y recaptando al paciente que ha abandonado el seguimiento en el dispositivo específico. Además, suele encargarse del seguimiento de los pacientes tratados por un problema físico y que no presentan dependencia. Debe conocer las posibilidades de tratamiento para el abordaje de determinados pacientes que rechazan sistemáticamente el ser atendidos en Servicios de Salud Mental o centros especiales de alcohólicos.

Como se ha comentado anteriormente en otros apartados de esta memoria el consumo de etanol produce una serie de acciones sobre diferentes sistemas. Se comporta como un agente gabérgico y opioidérgico, disminuye el efecto del glutamato sobre los receptores NMDA y su uso habitual ocasiona una disminución de la función serotoninérgica y dopaminérgica, así como una inhibición de los canales del calcio, mientras que por el contrario estimula la acción de los segundos mensajeros intracelulares. El etanol también produce acetaldehído en su proceso de metabolización. Las alternativas terapéuticas consiguen, de una u otra manera, evitar el consumo por alguna de las siguientes estrategias: a) hacer que el consumo de etanol sea aversivo, mediante la utilización de inhibidores de la metabolización del acetaldehído, b) que disminuyan los signos y síntomas de abstinencia condicionados a las situaciones de

consumo, de manera que el deseo de beber será menos intenso y evitable mediante el uso del acamprosato, c) que el consumo de etanol, si se produce, sea menos reforzante mediante la utilización de la naltrexona y d) disminuyendo la sintomatología depresiva que en ocasiones suele preceder a la recaída con fármacos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o el litio.

#### ***2.4. Fármacos antidipsotrópicos, aversivos o interdictores.***

Estos fármacos inhiben la aldehído deshidrogenasa hepática que cataliza la oxidación del acetaldehído a acetato, acumulándose acetaldehídos. El paso a la sangre del aldehído, que es altamente tóxico, produce la típica reacción alcohólica. En función de la cantidad de etanol ingerida, pueden aparecer ruborización excesiva, palpitaciones en cabeza y cuello, taquicardia, náuseas, debilidad, visión borrosa, dificultad respiratoria, dolor torácico y en casos graves, colapso cardiocirculatorio. En el caso del **disulfiram** la inhibición de la aldehído deshidrogenasa irreversible por lo que para la nueva síntesis de la ALDH se requieren varios días tras haber dejado de darlo. Con la **cianamida cálcica** el 80% de la ALDH se recupera tras 24 horas. El disulfiram inhibe además otras enzimas como la dopamina beta-hidroxilasa y la función de las oxidasas relacionadas con los microsomas, de forma que puede agravar determinadas patologías psiquiátricas como la esquizofrenia y el trastorno bipolar (por la elevación de la dopamina) y provoca el aumento de los niveles de fármacos que se metabolizan a través de las oxidasas.

No tienen ningún efecto psicotrópico, sino que, al paciente informado de su efecto, le sirven como un "freno psicológico" ante circunstancias concretas que le incitan al consumo. Se han empleado durante años en los tratamientos de deshabituación, con resultados desiguales. Utilizados en un contexto punitivo-represivo, impuestos por los médicos o los familiares ante complicaciones graves, llevan casi siempre a actitudes opositoras más o menos explícitas (Brewer, 1986), con negativa a seguir el tratamiento o sustitución de la medicación para hacer creer que se sigue tomando.

Aunque en la bibliografía hay datos contradictorios sobre su eficacia cuando se estudian muestras amplias de pacientes, en la experiencia de los especialistas que trabajan con estos pacientes es habitual encontrar casos en los que estos fármacos han resultado de gran utilidad, al permitir periodos prolongados de abstinencia que posibilitan el empleo de otras mediadas rehabilitadoras, a veces tras varios intentos infructuosos con otros abordajes.

Aunque los fármacos que se emplean con este fin son el disulfiram y la cianamida cálcica, hay otros fármacos de uso común que tienen también este efecto, denominado generalmente "efecto antabús", como el metronidazol, el ketoconazol y la cefotaxima.

#### *2.4.1. Disulfiram.*

El disulfiram se emplea en forma oral, generalmente a dosis de 1 comprimido al día. A menudo se ha empleado también en forma de implante subcutáneo, con una hipotética duración de hasta un año, pero en la actualidad esta práctica está en desuso, por lo errático de la absorción y la frecuencia y gravedad de los efectos secundarios.

Se debe iniciar al menos doce horas tras la última ingesta de etanol, y hay que advertir que, tras varias semanas tomándolo, su efecto se puede prolongar varios días tras la suspensión, por lo que no debe reiniciarse el consumo de etanol inmediatamente. El disulfiram puede interaccionar con las difenilhidantoinas, sulfonilureas, haloperidol, warfarina, isoniacida, inhibidores de la monoaminoxidasa, barbitúricos, antidepresivos tricíclicos, antihistamínicos, bloqueadores alfa y beta, clordiacepóxido y diacepam. Está contraindicado en las psicosis, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, epilepsia, diabetes, insuficiencia renal crónica y en la gestación.

#### *2.4.2. Cianamida cálcica.*

La cianamida tiene menos contraindicaciones e interacciones, pero también es menos eficaz para producir la reacción aldehídica. La duración de su efecto es menor, por



lo que deben administrarse dos o tres tomas al día. Sin embargo, en pacientes bien informados y motivados puede ser suficiente una pequeña dosis una vez al día, para que cumpla su efecto de "freno psicológico". Hay que recordar que los interdictores son útiles mientras ayuden a mantener una abstinencia absoluta. Si el paciente empieza a experimentar con el efecto de pequeñas cantidades de etanol habría que suspender inmediatamente su uso independientemente de la gravedad de la reacción producida. La cianamida está contraindicada en caso de enfermedad tiroidea por su efecto antitiroideo. Aunque no está contraindicada, se recomienda vigilar o evitar su uso en procesos médicos graves en los cuales supondría un grave riesgo la presentación de una reacción alcohólica.

### ***2.5. Fármacos que disminuyen el deseo y la compulsión por la bebida.***

En las dos últimas décadas se ha producido un avance considerable en el conocimiento del sistema biológico de recompensa. En la actualidad se sabe que el etanol comparte con otras sustancias de abuso la capacidad de actuar sobre dicho sistema aumentando la actividad de la dopamina en el núcleo accumbens. Ello da lugar al **refuerzo** (que determina que la conducta tienda a repetirse en el futuro) y a la **pérdida de control** tras iniciar el consumo (el efecto cebador por el cuál las primeras consumiciones producen un aumento del deseo de seguir consumiendo y debilitan la capacidad de resistirse al mismo).

Como hemos dicho anteriormente el etanol aumenta la actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens de forma indirecta, aumenta la actividad del sistema opioide endógeno y éste, a su vez, produce un aumento en la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico. Ello ha dado lugar al empleo de la naltrexona que bloquearía la hiperactividad opioide eliminándose la capacidad del etanol para producir estos efectos.

También el sistema serotoninérgico está implicado a diversos niveles en el sistema de recompensa y el etanol produce cambios en su función, aunque la

significación clínica en la fenomenología del alcoholismo es poco conocida. Existe una amplia tradición de uso de fármacos con actividad serotoninérgica en trastornos del control de impulsos entre ellos la adicción a sustancias, a raíz de lo observado en el Trastorno Obsesivo Compulsivo, enfermedad con la que se han relacionado.

#### 2.5.1. Naltrexona.

La naltrexona es un antagonista no selectivo de los receptores opioides que bloquea de forma reversible los efectos de los narcóticos al actuar como antagonista competitivo en los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . Existe una amplia experiencia de su uso en adicción a opiáceos y en este campo, se administra para bloquear completamente el efecto de cualquier consumo de opiáceos que pueda hacer el paciente, disuadiéndole por tanto de ello. En el caso del etanol, la naltrexona no parece afectar de forma relevante a las sensaciones subjetivas que se experimentan con el consumo del mismo (Swift, 1995), sino que afecta sólo a la tendencia a la repetición.

El etanol en pequeñas cantidades provoca un aumento de la actividad opioide, lo que, a su vez, provoca un aumento de la actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens. Este último factor es el que confiere al etanol su capacidad de producir refuerzo, es decir, de inducir en el organismo la motivación para intentar repetir la experiencia en el futuro. Además, la estimulación dopaminérgica inicial provoca instantáneamente un aumento del deseo de seguir consumiendo. Mediante el bloqueo de los receptores opioides, la naltrexona bloquea el efecto reforzador del etanol tras su consumo. De esta forma los consumos iniciales de etanol perderán su capacidad de refuerzo, y la conducta de consumo acabará por extinguirse, además, tras una primera consumición, el paciente no perderá el control cayendo en un consumo compulsivo (O'Malley y cols., 1996). Los estudios con animales y los ensayos con pacientes alcohólicos corroboran estas hipótesis: la naltrexona es eficaz en el tratamiento del alcoholismo, en términos generales, sin embargo, ha demostrado ser especialmente eficaz para cortar la progresión hacia la recaída de aquellos pacientes que durante el tratamiento han realizado algún

pequeño consumo de etanol, siendo menos clara su eficacia para reducir el deseo por consumir si no se ha bebido antes ([Jiménez-Arriero y cols.,1998](#)).

Las diferencias biológicas entre cepas de animales que tienen una alta preferencia con el etanol y cepas con baja preferencia por el etanol, señalan que en las primeras podría haber una alteración del sistema opioide, con un menor tono basal y un mayor incremento de actividad en respuesta al estímulo con etanol, es decir, estos animales percibirían de forma más intensa el efecto reforzador del etanol. También en seres humanos se han encontrado diferencias similares entre individuos de alto y bajo riesgo en función de sus antecedentes familiares. Todo ello lleva a proponer la existencia de un subgrupo de pacientes alcohólicos que habrían acabado desarrollando la enfermedad por padecer una mayor susceptibilidad del sistema opioide a los efectos del etanol.

La naltrexona es eficaz, para bloquear el descontrol sobre el consumo y la progresión a la recaída en aquellos pacientes que inician la ingesta de etanol durante el tratamiento de deshabituación, aumentando con ello la adherencia al tratamiento y un mejor cumplimiento terapéutico ([Jiménez-Arriero et al. 1998](#)). La naltrexona puede además combinarse con otros fármacos que tengan capacidad de modular el consumo de etanol, como ISRS, tiapride o acamprosato, así como con abordajes psicoterápicos, como un tratamiento complementario dentro del abordaje integral individualizado para cada paciente.

Los estudios en los que se ha comparado frente a placebo confirman su eficacia, para disminuir las recaídas en dependientes del etanol y en sujetos no dependientes que abusaban del etanol. De ahí que se preconice su utilización en pacientes en los que predomine la dependencia psicológica, por su bloqueo de las acciones reforzantes.

La naltrexona se utiliza a dosis de 50 mg/día en dosis única, por la mañana o la noche, en función de que se experimente somnolencia o insomnio con su uso. Está contraindicada en casos de hepatopatía grave. Aunque se han descrito elevaciones de

transaminasas asociadas a su uso en dosis altas en obesidad y adicción a opiáceos, esta circunstancia no se ha observado en el tratamiento de pacientes alcohólicos a las dosis referidas.

#### 2.5.2. Acamprosato.

Además de su actividad sobre el sistema de recompensa, el etanol actúa sobre múltiples sistemas del sistema nervioso central, entre ellos los de aminoácidos transmisores (GABA y glutamato). La administración de etanol produce una disminución de la actividad glutamatérgica, que es excitante. Con el consumo repetido, el organismo "aprende" a predecir cuándo se va a consumir etanol, por medio de señales condicionadas que le "avisan" de la proximidad del suceso. Ante estas señales (entrar a un bar; ver a alguien bebiendo, etc.), el organismo reacciona produciendo un aumento de la actividad glutamatérgica, para contrarrestar el descenso que producirá el etanol. Esto daría lugar a la sintomatología ansiosa y disfórica asociada al deseo que los pacientes experimentan ante la exposición a estímulos que les recuerdan el consumo y que tiene capacidad de inducirles a una recaída. El acamprosato bloquearía el efecto de un exceso de glutamato sobre el receptor NMDA, impidiendo que se traduzca clínicamente en las sensaciones descritas y favoreciendo que el paciente mantenga la abstinencia ([Spanegel y Zieglgonsberger, 1997](#)). Se desconoce, aunque no se descarta, una actividad específica en los circuitos de recompensa y aprendizaje, donde se sabe que glutamato y GABA tienen un papel fundamental.

El acamprosato no produce aversión por el etanol, no inhibe sus efectos gratificantes ni reemplaza o potencia sus efectos. Los estudios a largo plazo indican que tras un año de tratamiento, el porcentaje de pacientes tratados con acamprosato superaba en más del 10% al porcentaje tratado con placebo. Además, la utilización de aversivos como el antabús mejoraba las tasas de abstinencia. Los resultados de estos trabajos no pueden compararse con los llevados a cabo con naltrexona. En Europa se

entiende por recaída cuando el individuo ha bebido etanol, mientras que en Estados Unidos se considera como tal cuando se ha sobrepasado el consumo de riesgo.

Se utiliza a dosis de 1998 mg/día, (2 comprimidos de 333 mg cada 8 horas, o 999 mg cada 12 horas), advirtiéndose que debe tomarse antes de las comidas, pues los alimentos afectan de forma importante a su absorción. No se une a proteínas plasmáticas ni se metaboliza en el organismo, eliminándose principalmente por vía renal. No hay contraindicación en caso de hepatopatía, pero sí en caso de insuficiencia renal. Es bien tolerado, y como efecto secundario más frecuente aparece diarrea y más raramente estreñimiento, náuseas y dolores abdominales. No interacciona con los fármacos habitualmente utilizados en estos pacientes, ni tampoco con el etanol.

### 2.5.3. Tiapride.

Aparte de su uso en desintoxicación, el tiapride puede emplearse durante la fase de deshabituación. Una estrategia posible es el empleo de fármacos que bloqueen el efecto dopaminérgico de las sustancias de abuso, como los neurolépticos. Sin embargo, los neurolépticos clásicos producen un intenso bloqueo de los receptores de dopamina, sobre todo los D<sub>2</sub>, lo que agrava los síntomas de apatía, anhedonia y disforia que experimentan los pacientes por la hipodopaminérgia que se produce tras el abandono de una sustancia adictiva. Por otra parte, los agonistas de estos receptores, utilizados para aliviar estos síntomas sin que el paciente tenga que recurrir al etanol pueden disparar la sensación de deseo por el efecto cebador.

El tiapride es una benzamida con una actividad antagonista específica sobre los receptores D<sub>2</sub> previamente hipersensibilizados. Por ello, podría disminuir el deseo que se produce al encontrarse con estímulos que evocan el consumo de etanol, sin agravar la hipodopaminérgia. Los estudios sobre su empleo en deshabituación no han podido encontrar un efecto específico sobre el deseo por el consumo de etanol, pero han constatado que los pacientes en tratamiento mantienen con más éxito la abstinencia y

muestran una mejor puntuación en las escalas que miden estado anímico y satisfacción (Shaw y cols., 1994). Este efecto sobre el consumo de etanol no parece exclusivamente debido a su efecto ansiolítico ya que se ha observado que es superior a benzodiazepinas en el tratamiento de deshabituación.

Suele utilizarse a dosis de 300 mg/día. Es infrecuente la presentación de síntomas extrapiramidales, pero, al igual que otros fármacos de esta familia, puede producir hiperprolactinemia y el síndrome clínico correspondiente (galactorrea, amenorrea o impotencia).

#### 2.5.4. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).

Los antidepresivos de este grupo se han venido utilizando en alcoholismo a partir de las siguientes observaciones: 1) alta eficacia de estos compuestos en el tratamiento del Trastorno Obsesivo Compulsivo, que se ha relacionado fenomenológica y nosológicamente con los trastornos del control de impulsos, entre ellos las adicciones, 2) eficacia probada en el tratamiento de los trastornos depresivos, que con gran frecuencia coexisten con el alcoholismo, existiendo una importante controversia sobre la posible intervención de los trastornos afectivos en la génesis de la adicción al etanol, 3) hallazgos repetidos de disfunción del sistema serotoninérgico en pacientes con trastornos del control de impulsos en general y dependencia del etanol en particular, 4) Hallazgo de disfunciones serotoninérgicas en animales con alta propensión al desarrollo de alcoholismo y 4) estudios de eficacia de los ISRS en alcoholismo y otras adicciones, aunque estos trabajos han mostrado resultados contradictorios.

En la actualidad, se tiende a considerar que los ISRS son eficaces en aquellos pacientes que tienen sintomatología depresiva relevante y persistente tras la abstinencia y en los que tienen antecedentes de patología depresiva. En estos pacientes, los ISRS no sólo controlarían la clínica afectiva, sino que tendrían también un efecto

positivo sobre el mantenimiento de la abstinencia y la propensión a las recaídas (Cornelius y cols., 1993).

El fármaco más usado es fluoxetina, por ser el que cuenta con mayor experiencia. No parecen existir diferencias en cuanto a su eficacia para otros antidepresivos de la misma familia, como sertralina o fluvoxamina por lo que se suelen elegir en función del perfil de efectos secundarios y las potenciales interacciones. Existen menos interacciones en el caso de sertralina (a dosis de 50-100 mg/día) y citalopram (a dosis de 40 mg/día). Con este último fármaco existen estudios que parecen encontrar una eficacia más clara pero su beneficio se mantiene un corto espacio de tiempo. Estos constituyen el tratamiento de elección de los trastornos depresivos en el alcohólico.

## ***Planteamiento de la Investigación***

El etanol es la droga de abuso más extendida y consumida con fines recreativos después de la cafeína. A su vez, el alcoholismo constituye un grave problema de salud pública que no solo causa enormes daños a la salud y a la calidad de vida del que lo padece sino que además socava el bienestar de la familia y la sociedad.

Las causas del consumo abusivo de etanol y el alcoholismo son complejas y reflejan la interacción de factores genéticos, ambientales, socioculturales y personales (efectos motivacionales positivos y negativos) y su tratamiento debe ser integral abarcando aspectos farmacológicos, psicoterapéuticos y psicosociales, siendo fundamentales los equipos de especialistas, la familia, el entorno y los grupos de autoayuda. En la mayoría de los casos se trata de una enfermedad difícil de tratar y son



frecuentes los pacientes en los que esta patología es irreversible, incontrolable e incurable. Muchos de estos pacientes alternan períodos problemáticos con la bebida con otros sin problemas, con interfases de abstinencia o de ingesta limitada sin problemas. Por otra parte, hay diferentes categorías de abuso por el etanol y cada una de ellas precisa un enfoque terapéutico diferente. No obstante, en general, los primeros objetivos en el tratamiento del alcoholismo incluyen el mantenimiento de la abstinencia, la prolongación del estado abstinentes y la reducción del deseo compulsivo de búsqueda de la droga si ocurre una recaída.

Debido al gran impacto que el consumo abusivo de etanol tiene en la sociedad se han realizado numerosos esfuerzos encaminados a entender la interacción del etanol con el sistema nervioso central y con la adquisición de la conducta adictiva. El desarrollo de modelos animales tras los hallazgos de las investigaciones básicas y epidemiológicas han permitido identificar componentes de la neurotransmisión cerebral implicados en la adicción y abstinencia del consumo excesivo de etanol y qué fármacos pueden resultar útiles en el tratamiento del alcoholismo. Desde este punto de vista, modificando estos neurotransmisores o actuando sobre sus receptores, se podrían modificar los mecanismos neuroquímicos que se desarrollan en una situación de dependencia. En este caso, el fármaco ideal sería aquel capaz de reducir el deseo de beber, de interferir con los efectos euforizantes buscados por el individuo a través de la droga o bien de provocar una reacción no deseada al consumir etanol.

En la actualidad, existe una larga lista de fármacos en estudio para el tratamiento del alcoholismo como la desipramina, ondansetron, ritanserina, risperidona, buspirona, baclofen, bromocriptina, tiapride, captopril, ..., pero desde un punto de vista clínico únicamente los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, el acamprosato y la naltrexona han tenido lanzamiento comercial, considerando al acamprosato y la naltrexona como fármacos de primera elección en el tratamiento de la dependencia alcohólica (Volpicelli y cols., 1992; O'Malley y cols., 1992; Anton y cols., 1999; Wilde y Wegstaff, 1997; Besson y cols., 1998; Tempesta y cols., 2000) restringiendo el uso de los

inhibidores de la recaptación de serotonina a los casos de comorbilidad con trastornos afectivos ([Kranzler y cols., 1995](#)).

El acamprosato y la naltrexona son bien tolerados y no hay evidencias de taquifilaxia, dependencia, síndrome de abstinencia o efecto rebote en el consumo de etanol cuando cesa el tratamiento ([Mason y cols., 2002](#); [Johnson y cols., 2003](#)). La principal diferencia entre ellos reside en su mecanismo de acción. Mientras la naltrexona bloquea los efectos reforzantes positivos tras la ingesta de etanol por bloqueo de los receptores opiodérgicos ([Gianoulakis, 1996](#); [Herz, 1997](#); [Swift y cols., 1994](#); [Cole y cols., 2000](#)), el acamprosato tiende a normalizar la alteración del sistema glutamatérgico inducida por el consumo crónico de etanol y la retirada de etanol reduciendo los efectos displicentes directos e indirectos de la abstinencia a etanol ([Littleton, 1995](#)).

El tratamiento con naltrexona previene las recaídas de bebedores fuertes ([Volpicelli y cols., 1992](#)), retrasa el primer consumo de etanol después de la deshabituación impidiendo la progresión del consumo puntual a la recaída definitiva ([Volpicelli y cols., 1992](#); [Oslin y cols., 1997](#)) y disminuye los efectos euforizantes del consumo de etanol por bloqueo del sistema opioide endógeno ([Volpicelli y cols., 1995](#)). Además, el empleo de la naltrexona presenta algunas ventajas en el tratamiento del alcoholismo no grave o no asociado a causas genéticas o personalidad antisocial al igual que mejora las expectativas de prevención de recaídas asociada a terapias de soporte ([O'Malley y cols., 1992](#); [Anton y cols., 1999](#)).

Los datos expuestos en la Introducción, sugieren que el etanol actúa sobre los sistemas de neurotransmisión inhibitoria (GABA) y excitatoria (glutamato) relacionándose estos efectos con algunas manifestaciones comportamentales como la disminución de la atención, las alteraciones de la memoria, los cambios de humor y la somnolencia ([Morrow, 1995](#); [Buck, 1996](#); [Crews y cols., 1996](#); [Tabakoff y Hoffman, 1996](#)). Además, existen otros sistemas de neurotransmisión muy importantes en el control del consumo de etanol y el desarrollo de la conducta adictiva como el sistema

dopaminérgico y el sistema opioide endógeno demostrado tanto estudios bioquímicos como comportamentales que intervienen directamente en los efectos adictivos del etanol (Hamilton y cols., 1979; Volpicelli y cols., 1986; Ulm y cols., 1995; Gessa y cols., 1985; Brodie y cols., 1999, 1990; Di Chiara e Imperato, 1988; Brodie y Appel, 1998). Es importante señalar que existe una interrelación entre el sistema opioide endógeno y el sistema dopaminérgico debido a la presencia de receptores opioides en el área ventral tegmental y el núcleo accumbens que son en gran parte responsables de los efectos reforzantes del etanol (Mansour y cols., 1988, 1994a, 1994b, 1994c, 1995; Svingos y cols., 1996, 1997, 1998). Esto se debe probablemente al hecho de que la activación de estos receptores estimula la actividad de neuronas dopaminérgicas en las terminales del sistema mesolímbico dopaminérgico.

### ***Hipótesis de Trabajo***

La relevancia del sistema opioide endógeno en la adicción por el etanol se ha evidenciado por el aumento de péptidos opioides en diversas regiones cerebrales (Rasmussen y cols., 1998; Gianoulakis y Barcomb, 1987; Thiagarajan y col., 1989; Kinoshita y cols., 2000; de Waele y cols., 1992, 1994; Nylander y cols., 1994; Cowen y cols., 1998; 1999a; Li y cols., 1998; Jamensky y Gianoulakis, 1997; Sandi y cols., 1988; Williams y Woods, 1998), la correlación entre los aumentos de  $\beta$ -endorfina y el riesgo de dependencia a etanol en humanos (Aguirre y cols., 1990; Gianoulakis y cols., 1989; 1996) y la demostración clara y evidente de que en animales genéticamente manipulados desprovistos de receptor  $\mu$  opioide no se produce reforzamiento y por lo tanto no se desarrolla el fenómeno de la dependencia (Hall y cols., 1999; Roberts y cols., 2000).

Además, el etanol activa el sistema mesolímbico dopaminérgico aumentando la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental (Gessa y cols., 1995; Brodie y cols., 1990) y la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Weiss y cols., 1993, 1996). De hecho, los animales son capaces de auto-administrarse etanol directamente en el área ventral tegmental (Gatto y cols., 1994). Además, utilizando animales manipulados genéticamente o modificando la expresión génica de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 se ha comprobado que se reducen los efectos reforzantes del etanol y la preferencia de consumo en animales preferentes (Myers y Robinson, 1999; Samson y cols., 1992; Hodge y cols., 1997; Slawecky y cols., 1997).

El hecho de que el etanol y otras drogas de abuso modifiquen el mecanismo de transducción de señales que regula la expresión génica celular ha reforzado la hipótesis de que los genes, a través de interacciones proteína-proteína o ADN-ADN contribuyen al desarrollo de la dependencia.

A pesar de que podemos encontrar un buen número de trabajos en la literatura de los efectos del etanol sobre algunos aspectos de la actividad dopaminérgica y opiodérgica, poco se conoce sobre los efectos que tiene el consumo de etanol sobre la expresión génica de los péptidos opioides y la tirosina hidroxilasa.

Conocer pues como el etanol modifica la actividad del sistema opioide endógeno y del sistema mesolímbico dopaminérgico a través del estudio de la modificación de la expresión génica de los péptidos opioides y de la tirosina hidroxilasa permitiría identificar una serie importante de marcadores neuroquímicos y moleculares cerebrales asociados a la adicción, abstinencia y respuesta al tratamiento, que sin duda podrían contribuir a diseñar fármacos más eficaces en el tratamiento del alcoholismo.

## ***Objetivos de la Investigación***

### **Objetivos Generales:**

1. Analizar la influencia de los diferentes tipos de patrones de consumo de etanol en modelo animal de rata sobre la expresión génica de péptidos opioides y de tirosina-hidroxilasa.
2. Estudiar los sustratos neuroquímicos y conductuales de 2 razas de ratas que presentan diferente vulnerabilidad genética por el consumo de etanol.
3. Estudiar las alteraciones neuroquímicas y comportamentales por el etanol y la naltrexona en un modelo de consumo excesivo de etanol.

**Objetivos específicos:**

1. Determinación del curso temporal de los efectos de la administración aguda de etanol sobre la expresión de péptidos opioides y de tirosina hidroxilasa en el cerebro e hipófisis en ratas de raza Wistar.
2. Estudiar las diferencias en la respuesta neuroquímica (expresión génica) y de consumo de etanol en ratas de raza Wistar con patrón de consumo forzado, preferente y no preferente. Establecimiento de un modelo de consumo de etanol.
3. Estudiar las diferencias en el consumo de etanol y en la actividad neuroquímica funcional entre razas de ratas espontáneamente vulnerables por el consumo de etanol (Fawn-Hooded) y no preferentes (raza Wistar).
4. Determinar las alteraciones neuroquímicas (expresión génica) inducidas por la abstinencia espontánea por el consumo de etanol en ratas preferentes de la raza Fawn Hooded. Estudio curso temporal.
5. Determinar las alteraciones comportamentales y neuroquímicas inducidas por el consumo de etanol y naltrexona en un modelo de consumo excesivo de etanol en ratas de raza Wistar.

## ***Materiales y Métodos***

### **1. Animales de experimentación.**

Los animales utilizados fueron machos Wistar adultos, procedentes de Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona) para los estudios agudo, crónico y de evaluación de la naltrexona y Fawn-Hooded procedentes de Janvier (Francia) para el estudio de abstinencia. Los animales se estabularon en las instalaciones del Animalario del Hospital Universitario 12 de Octubre con libre acceso al agua y la comida en todo momento y en condiciones ambientales constantes de luz (12 h. oscuridad (luz roja)/ luz blanca), temperatura (20º C) y humedad relativa (50 %).



Todos los experimentos realizados en el transcurso de este trabajo se ajustan al Real Decreto 223/1998 del 14 de Marzo y a la Orden Ministerial del 13 de Octubre 1989 referente a la protección de animales de experimentación, así como a la Directiva del 24 de Noviembre 1986 (86/609/EEC) del Consejo de la Comunidad Europea.

## **2. Fármacos y compuestos utilizados.**

El etanol utilizado para los experimentos en este trabajo fue adquirido en el Hospital 12 de Octubre y la sacarosa a Grupo Cofares (Madrid, España). La naltrexona se obtuvo a través de Sigma Química (Sigma-Aldrich-Fluka, S.A., Madrid, España).

Los reactivos orgánicos generales, así como las sales inorgánicas utilizadas en las diferentes técnicas fueron las indicadas a continuación:

### ***2.1. Procedimientos histológicos.***

Los tejidos embebidos en gel criogénico para el corte de secciones coronales) fue Tissue-Teck (Sakura, CA, USA) adquirido a través de PACISA-Giralt (Madrid, España) y el colorante utilizado para la correcta identificación del núcleo paraventricular fue azul de toluidina al 0,1% en acetato sódico 0,1 M, pH 6.5. Ambos productos fueron adquiridos en Sigma-Química (Sigma-Aldrich-Fluka, S.A., Madrid, España).

### ***2.2. Procedimientos histoquímicos.***

#### **a) Hibridación in situ**

Para el marcaje de las sondas empleamos el Kit Terminal Transferasa, la yeast tRNA, el esperma de salmón y la columna de purificación Sephadex G-25 que se compraron a Roche

Diagnostics (Barcelona, España). El [ $^{35}\text{S}$ ]-dATP $\alpha$ S (10  $\mu\text{Ci/mL}$ , 250  $\mu\text{Ci}$ ) se adquirió de Amersham Internacional, Amersham (Madrid, España).

Los oligonucleótidos de proencefalina, factor liberador de corticotropina (NEP-554), tirosina hidroxilasa (NEP-529) y prodinorfina se adquirieron a Perking Elmer (Pacisa-Giralt, Madrid, España). Los oligonucleótidos para el receptor cannabinoide CB1 se adquirió a Genotek (Sabadell, España), el oligonucleótido del transportados de serotonina se adquirió a Afigen (Madrid, España) y la proopiomelanocortina a Advanced Biotechnology Center (Londres, Inglaterra).

Los reactivos químicos generales utilizados para la histoquímica por hibridación "in situ" fueron formaldehído (37%), cloruro sódico, citrato trisódico, anhídrido acético, trietanolamina, solución Denhardt, formamida desionizada, EDTA y dextran sulfato que se obtuvieron de Sigma Química (Sigma-Aldrich-Fluka S.A., Madrid, España). También se utilizó etanol absoluto y de 96 $^{\circ}$ , cloroformo, dihidrógeno ortofosfato potásico e hidrógeno ortofosfato disódico que se adquirieron a Merck (Madrid, España). El líquido revelador para los autorradiogramas fue el Kodak D-19 y el líquido fijador empleado fue AGF ambos adquiridos en Sigma Química (Sigma-Aldrich-Fluka S.A., Madrid, España).

Para la preparación del gelatinizado de los portas se utilizó dietilpirocarbonato (permite la degradación de las ARNasas) para la preparación de agua estéril comprándose a Sigma Química (Sigma-Aldrich-Fluka S.A., Madrid, España). La gelatina y el sulfato de cromo (III) y potasio dodecahidratado que fueron adquiridos a Merck (Madrid, España).

b) Fijación de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO.

Los reactivos generales utilizados en la preparación de las soluciones para determinar la funcionalidad de los receptores  $\mu$  se adquirieron a Sigma Química (Sigma-Aldrich-Fluka, S.A., Madrid, España) y fueron cloruro sódico, cloruro de magnesio, EDTA, ditiotreitol, Trizma Base, GDP y ácido clorhídrico. El [ $^{35}\text{S}$ ]-dGTP $\gamma$ S (10  $\mu\text{Ci/mL}$ , 250  $\mu\text{Ci}$ ) se

adquirió de Amersham Internacional, Amersham (Madrid, España). El agonista del receptor  $\mu$  utilizado, DAMGO, se adquirió en Tocris (Biogen, Madrid, España).

### **3. Procedimientos histológicos.**

#### ***3.1. Cortes de cerebro e hipófisis en criostato.***

Los animales fueron sacrificados por decapitación, y los cerebros e hipófisis fueron rápidamente extraídos y congelados sobre hielo seco. Los tejidos fueron embebidos en gel criogénico (Tissue-Teck, Sakura, CA, USA) sobre placas de criostato (Bright Instruments, Londres, Inglaterra). Se cortaron secciones coronales de 12  $\mu$ m de grosor montándose sobre portaobjetos gelatinizados libres de ARNasas. Los cortes obtenidos, se secaron sobre placa caliente (37<sup>º</sup> C) y se almacenaron a -80<sup>º</sup> C hasta el día del ensayo.

Los cortes cerebrales (dos secciones /porta) y las secciones de hipófisis (ocho secciones/porta) se obtuvieron de forma seriada con el fin de obtener secciones rostrales y caudales en un mismo portaobjetos.

Las secciones estudiadas en este trabajo, contenían: (1) caudado-putamen y núcleo accumbens (lámina 16; [Atlas de Paxinos y Watson, 1986](#)), núcleo paraventricular (lámina 25), núcleos ventromedial, arqueado e hipocampo (lámina 28) y sustancia nigra y área ventral tegmental (lámina 39). Las secciones de hipófisis contenían tanto el lóbulo anterior como el intermedio.

#### ***3.2. Tinciones histológicas.***

Debido al pequeño tamaño del núcleo paraventricular, fue necesario utilizar métodos de tinción y observación microscópica para determinar su localización exacta. El colorante utilizado fue azul de toluidina al 0,1 % en acetato sódico 0,1 M; pH 6,5.

## 4. Procedimientos histoquímicos.

### 4.1. *Histoquímica por Hibridación “in situ”*

#### a) Preparación del tejido.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, y los cerebros e hipófisis fueron rápidamente extraídos y congelados sobre hielo seco. Los tejidos fueron cortados en criostato, obteniéndose secciones coronales de 12  $\mu\text{m}$ . Los portaobjetos utilizados fueron tratados con una solución de gelatina 0.25 % y sulfato crómico potásico 0.025 % en agua tratada con el inhibidor de ARNasas dietil-pirocarbonato (DPEC). Los cortes obtenidos, se secaron sobre placa caliente (37 $^{\circ}$  C) y se almacenaron a -80 $^{\circ}$  C hasta el día del ensayo.

#### b) Marcaje de la sonda

Los oligonucleótidos fueron marcados usando terminal deoxytransferasa de timo de cordero (Boehringer, Barcelona) para añadir una cola de [ $^{35}\text{S}$ ]-deoxiATP (actividad específica >1000 Ci/mmol; Amersham, Madrid) al extremo 3' en presencia de  $\text{CoCl}_2$  y tampón Tris ClH/cacodilato potásico. Este marcaje de las sondas es un proceso delicado en el que es esencial trabajar en frío durante todo el proceso.

En un tubo eppendorf estéril ponemos 10  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 5X (Cacodilato potásico 1 M, Tris ClH 125 mM, pH 6,6; albúmina de suero bovino 1,25 mg/ml); 5  $\mu\text{l}$  de cloruro de cobalto (25 mM); 24  $\mu\text{l}$  de agua estéril (para un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ ); 5  $\mu\text{l}$  de sonda (5  $\mu\text{M}$ ); 5  $\mu\text{l}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]-dATP $\alpha\text{S}$  (10  $\mu\text{Ci/mL}$ , 250  $\mu\text{Ci}$ ) y por último 1  $\mu\text{l}$  de Terminal transferasa (25 unidades).

La reacción de marcaje se llevó a cabo a 37 $^{\circ}$  C durante 60 minutos y se añadieron 12,5 unidades adicionales de terminal transferasa transcurridos los primeros 30 minutos con el fin de incrementar la incorporación del nucleótido radioactivo.

Los oligonucleótidos marcados fueron purificados en columnas de Sephadex G25 a 12.400 r.p.m.. Por último, se determinó la actividad específica de los oligonucleótidos marcados tomando 1 µl de sonda en un vial con líquido de centelleo (10 ml) y medida en un contador beta. La actividad específica media fue de  $2-7,5 \times 10^5$  c.p.m. Los oligonucleótidos se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el día del ensayo.

Los oligonucleótidos utilizados contenían 48 bases complementarias a las secuencias de proencefalina, tirosina hidroxilasa, factor liberador de corticotropina, proopiomelanocortina, prodinorfina, transportador de serotonina y receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Las secuencias 5' 3' de los respectivos oligonucleótidos son:

<i>Gen</i>	<i>Nucleótidos</i>	<i>Secuencia</i>
Tirosina Hidroxilasa	(nt 1223-1252)	TCA-AAG-GCT-CGG-ACC-TCA-GGC-TCC-TCT-GAC
Proencefalina	(nt 388-435)	ATC-TGC-ATC-CTT-CTT-CAT-GAA-ACC-GCC-ATA-CCT-CTT-GCG-AAG-GAT-CTC
Proopiomelanocortina	(nt 96-134)	CTT-CTT-GCC-CAC-CGG-CTT-GCC-CCA-GCG-GAA-GTG-CTC-CAT-GGA-GTA-GGA.
Prodinorfina	(nt 913-960)	CCG-AGT-CAC-CTT-GAA-CTG-ACG-CCG-CAG-AAA-ACC-ACC-ATA-GCG-TTT
Receptor cannabinoide CB <sub>1</sub>	(nt 4-51)	GGT-GAT-GGT-ACG-GAA-GGT-GGT-GTC-TGC-AAG-GCC-ATC-TAG-GAT-CGA-CTT
	(nt 349-396)	AAC-CGT-GAA-GGT-GCC-CAG-TGT-GAG-GGA-CAG-TAC-AGC-GAT-GGC-CAG-CTG
	(nt 952-999)	AGG-CCG-GGT-CAC-CTG-CAC-CTT-GCC-GTC-TTC-TGA-CGT-GTG-GAT-GAT-GAT
Factor liberador de corticotropina	(nt 65-111)	GGC-CCG-CGG-CGC-TCC-AGA-GAC-GGA-TCC-CCT-GCT-CAG-CAG-GGC-CCT-GCA
Transportador de Serotonina	(nt 77-126)	ACT-GCA-GAG-TAC-CCA-TTG-GAT-ATT-TGG-CTA-GGC-TCT-GCC-CTG-TCC-GCT-GT

c) Prehibridación.

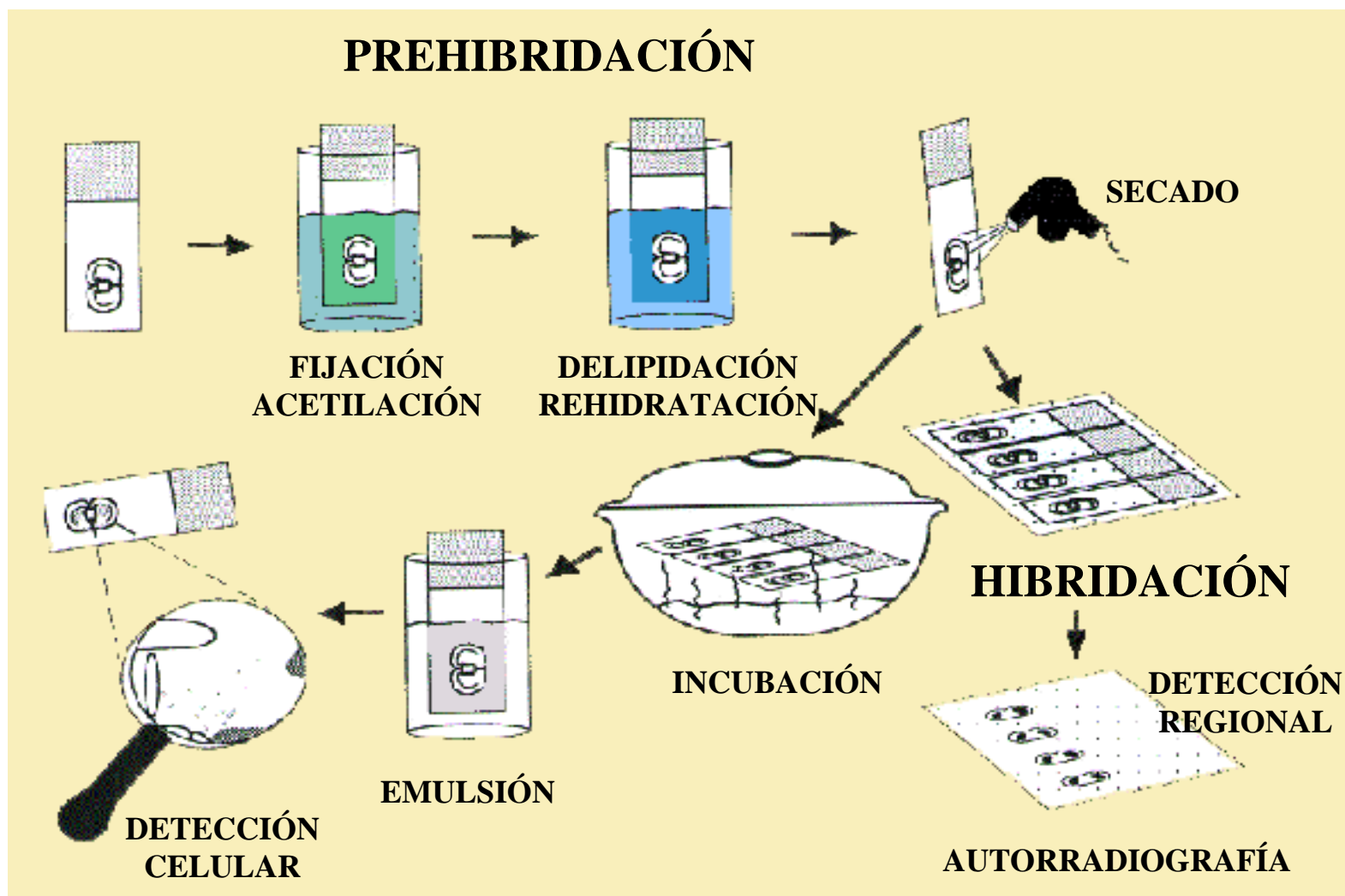
Los tratamientos de prehibridación contribuyen a incrementar la sensibilidad del ensayo; mantienen la morfología celular, reducen la unión electrostática de la sonda al tejido bloqueando los grupos amino de las proteínas y disminuye los niveles de fondo en la hibridación del tejido.

Se toman las muestras de tejido del congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dejándose descongelar y secar a temperatura ambiente unos 10-15 minutos y se montan en cubetas de plástico estériles donde se llevaron a cabo todos los procesos de la técnica.

Se sumergieron los portas en una solución al 4 % de formaldehído en tampón fosfato-salino (PBS) (durante 5 minutos) que permite fijar el tejido y posteriores lavados con PBS para eliminar el exceso de formaldehído. Después se lavaron 10 minutos con 0,25 % de anhídrido acético y 0,1 M de trietanolamina en suero fisiológico, para reducir la unión no específica del ligando radioactivo al tejido y posteriormente se realizaron sucesivos lavados con etanol a distintas concentraciones (70, 80, 95, 100 %), que permiten deshidratar el tejido; lavado con cloroformo 100 % para aumentar la especificidad de la unión, y de nuevo lavados con etanol (100, 95 %) para eliminar cualquier exceso de cloroformo sobre el tejido. Por último, se dejan secar las muestras a temperatura ambiente durante 10-15 minutos (Figura M-1).

d) Hibridación

La hibridación in situ se realizó según el protocolo descrito por [Young y cols \(1986\)](#) (Figura M-1). La concentración de la sonda marcada usada en nuestros experimentos fue aproximadamente  $2-5 \times 10^5$  c.p.m./sección, dicha concentración está de acuerdo con la utilizada por otros autores que han estudiado la expresión de genes opiáceos en el cerebro ([Rosen y cols., 1992](#); [Hurd y Herkenham, 1992](#); [Hammer y cols., 1993](#)).



**Figura M-1.** Representación gráfica de las distintas fases de la histoquímica por hibridación “in situ”

El día de la hibridación, la sonda radioactiva fue descongelada y añadida al tampón de hibridación [formamida desionizada 50 % (v/v), SSC 4X (SSC 1X compuesto por NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M; pH= 7,0), dextran sulfato 10 % (w/v), Denhardt 1X (ficoll, albúmina de suero bovino, poli-vinil-pirrolidona al 0,2 %), ADN (esperma) de salmón 500µg/ml (Boehringer Mannheim), ARNt de levadura 250 µg/ml y ditiotreititol 10 mM.

Esta mezcla fue aplicada sobre el tejido en un volumen de 50 µl y cada muestra se cubre por papel Parafilm®, procurando que toda la sonda marcada se extienda perfectamente y de forma homogénea por toda la preparación. Realizada esta operación se introducen en un recipiente y se lleva al incubador a 37º C durante 24 horas.

El proceso de hibridación tiene lugar a una temperatura que es aproximadamente 20º C inferior a la temperatura de fusión (Tm). Nuestra experiencia es que la incubación a 37º C produce unos excelentes resultados con todas las sondas utilizadas.

e) Posthibridación.

Extraídas las muestras del recipiente que los contenía para la incubación, se retira el papel Parafilm® con ayuda de una solución de SSC 1X, procurando que no queden en ningún momento sin líquido, para lo cual se introducen en las cubetas y se cubren con la misma solución anterior. Posteriormente, se realizan 4 lavados de SSC 1X de 15 minutos cada uno a una temperatura de 55º C con una ligera agitación para eliminar el resto de sonda radioactiva no unida al sustrato, y 2 lavados más también de SSC 1X a temperatura ambiente. Por último, se llevan a cabo varios sumergimientos en agua para la eliminación del exceso de esta solución y 1 lavado en etanol 96 % que facilitará el secado que se realiza en una estufa (Figura M-1).



## f) Autorradiografía

Se colocan los portas bien sujetos en chasis sobre los que se superpone la película reveladora (Kodak BioMax MR1, Amersham, Madrid) en cámara oscura bajo filtros de seguridad de luz roja. La película, con el tiempo de exposición adecuado y variable según el oligonucleótido marcado, quedará impresionada en su superficie, dándonos la distribución y localización del ARNm que buscamos. La Tabla M-1 muestra los tiempos de exposición para cada gen y región de este trabajo.

***4.2. Funcionalidad de receptores acoplados a proteínas G: Fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO.***

La fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por agonistas se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por [Sim y cols \(1995\)](#). Esta técnica se basa en el incremento de la unión del análogo radioactivo no hidrolizable de GTP [<sup>35</sup>S]-GTPγS a receptores acoplados a proteínas G cuando se encuentran en presencia de un agonista que estimule este tipo de receptores (Figura M-2). El procedimiento requiere de una previa inactivación de las proteínas G, desplazándolas hacia su estado basal en presencia de un exceso del nucleótido GDP.

## a) Estabilización.

Los portas con las secciones coronales de cerebro de 12 •m se descongelan con cuidado para no romper el tejido y se sumergen en un tampón de ensayo con Tampón 1 (Tris HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) a 25° C durante 10 minutos.

**Tabla M-1. Tiempos de exposición y regiones de hibridación para los distintos oligonucleótidos realizados en esta Tesis.**

<b>Gen</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Tiempo exposición</b>
<b>Proencefalina</b>	Caudado-Putamen, Accumbens	10 días
	Núcleo Paraventricular	15 días
	Núcleo Ventromedial	15 días
<b>Proopiomelanocortina</b>	Núcleo Arqueado	10 días
	Lóbulo Anterior (hipófisis)	24 horas
	Lóbulo Intermedio (hipófisis)	2 horas
<b>Prodinorfina</b>	Caudado-Putamen, Accumbens	25 días
	Núcleo Paraventricular	20 días
	Núcleo Supraóptico	20 días
<b>Tirosina Hidroxilasa</b>	Sustancia Nigra	15 días
	Área Ventral Tegmental	15 días
<b>Receptor cannabinoide CB1</b>	Caudado-Putamen, Accumbens	15 días
	Núcleo Ventromedial, Hipocampo	15 días
<b>Transportador de serotonina</b>	Núcleos Dorsal y Medio del Rafe	5 días
<b>Factor Liberador de Corticotropina</b>	Núcleo Paraventricular	10 días

b) Preincubación.

En esta fase la actividad de las proteínas G fue llevada a su nivel basal incubándose los portas a 25° C durante 15 minutos con Tampón 1 añadiéndole GDP 2 mM.

c) Incubación.

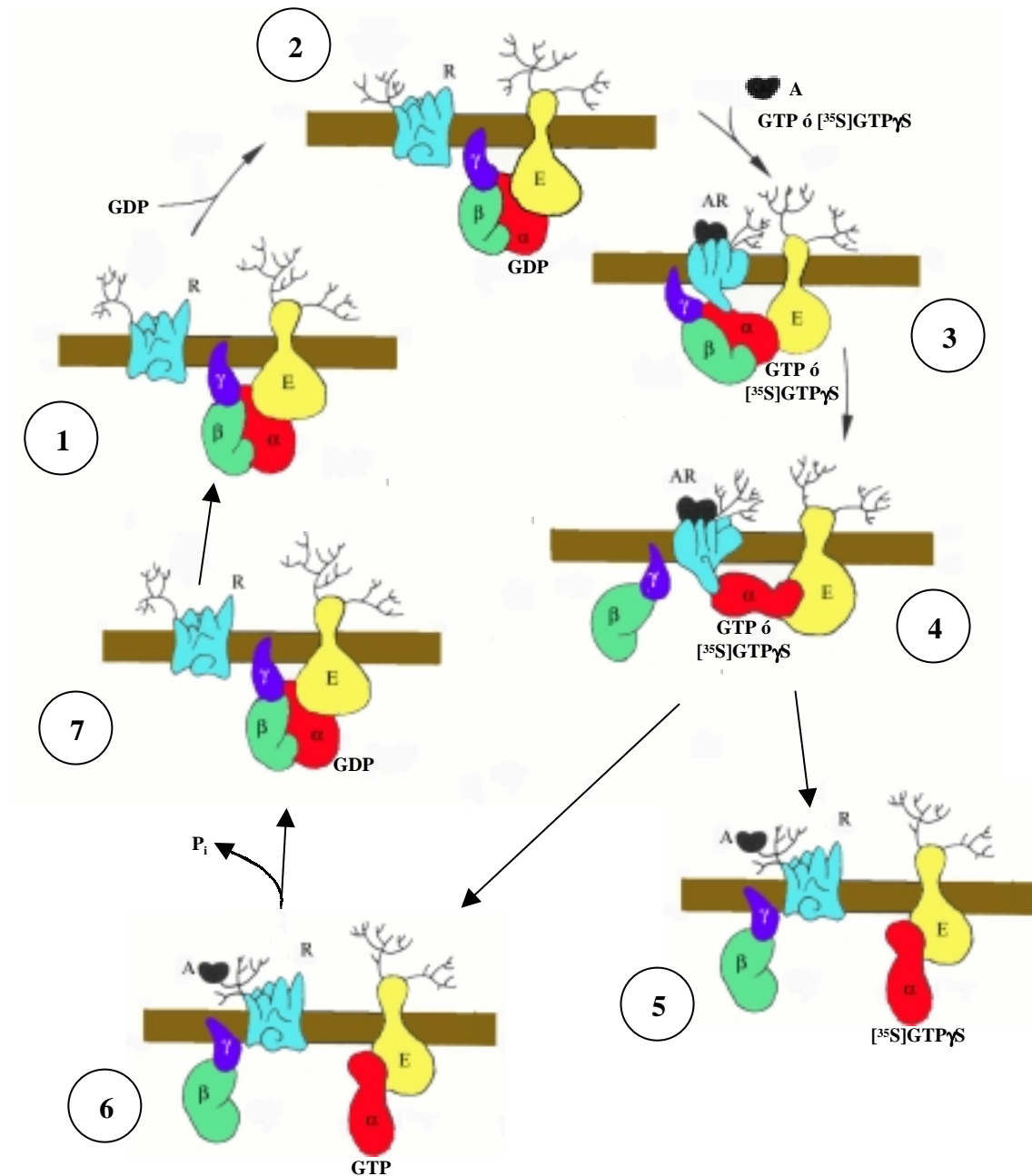
Las muestras se separan en dos grupos que determinarán la actividad basal (grupo basal) y la actividad estimulada (grupo estimulado) del receptor por el agonista DAMGO en los tejidos. El grupo basal se incuba con el tampón 1 añadiendo GTP $\gamma$ S 10  $\mu$ M y en el grupo estimulado se incuba con tampón 1 y [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 0.04 nM a una actividad específica de 1000 Ci/mmol, GDP 2 mM y DAMGO 3  $\mu$ M. Adicionalmente, se procesaron secciones con [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S 0,04 nM y GDP 2 mM, DAMGO 3  $\mu$ M y naloxona 0.3  $\mu$ M con el fin de comprobar la especificidad de la activación producida por el agonista. Todos los grupos fueron incubados a 25° C durante 2 horas.

d) Lavados

Tras la incubación, las secciones fueron lavadas dos veces en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 durante 15 minutos y una vez en agua desionizada para eliminar el resto de sales de los lavados y secadas al aire.

e) Autorradiografía

Se colocan los portas bien sujetos en chasis sobre los que se superpone la película reveladora (Kodak BioMax MR1, Amersham, Madrid) en cámara oscura bajo filtros de seguridad de luz roja. La película, con un tiempo de exposición de 48 horas, quedará impresionada en su superficie, dándonos la distribución y localización del receptor  $\mu$ .



**Figura M-2.** Fundamento de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  estimulada por agonistas. 1, estado inactivo del receptor; 2, fase de preincubación con exceso de GDP; 3, fase de incubación con agonista del receptor y GTP o  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  según el grupo experimental (basal o estimulado); 4, separación de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  y modulación de la actividad del efector por la subunidad  $\alpha$ ; 5, efector activado, en este caso la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  es irreversible y no permite la acción de la GTPasa; 6, efector activado en condiciones normales, hidrolizable por GTPasa desprendiendo  $\text{P}_i$ ; 7, retorno al estado inactivo del sistema por reasociación de las subunidades  $\alpha$ -GDP y  $\beta\gamma$ . A, agonista del receptor; R, receptor;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , subunidades proteínas G; E, efector (adenilato ciclase en nuestro caso).

## **5. Análisis de image.**

Nuestro sistema de análisis de imagen consiste en un ordenador PC equipado con una cámara de video (Kohu), una lupa de aumento lens (Leica MZ6, 0.32x y 1.0 x ), un transiluminador (Kaiser prolite 5000), una tarjeta de vídeo (IMAXX Plug-in 45 Mhz. Precision Digital Images Corporation, Redmont, WA, USA) y el software de dominio público NIH Image desarrollado en el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos y disponible en internet en <http://rbs.info.nih.gov/nih-image>.

Los autorradiogramas obtenidos fueron aumentados con la lupa y filmados con la cámara de vídeo. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas utilizando una tarjeta de video y analizadas con el programa informático NIH Image.

Con la ayuda del ratón, se seleccionaron las señales de hibridación (directamente sobre el núcleo) y el fondo (moviendo el cursor hacia una región adyacente fuera del núcleo, pero dentro del tejido). Utilizando la función In calibración (*uncalibrated*), se obtuvieron medidas de densidad óptica restando a cada medida de señal de hibridación su respectivo fondo y se expresaron como valores en escala de grises.

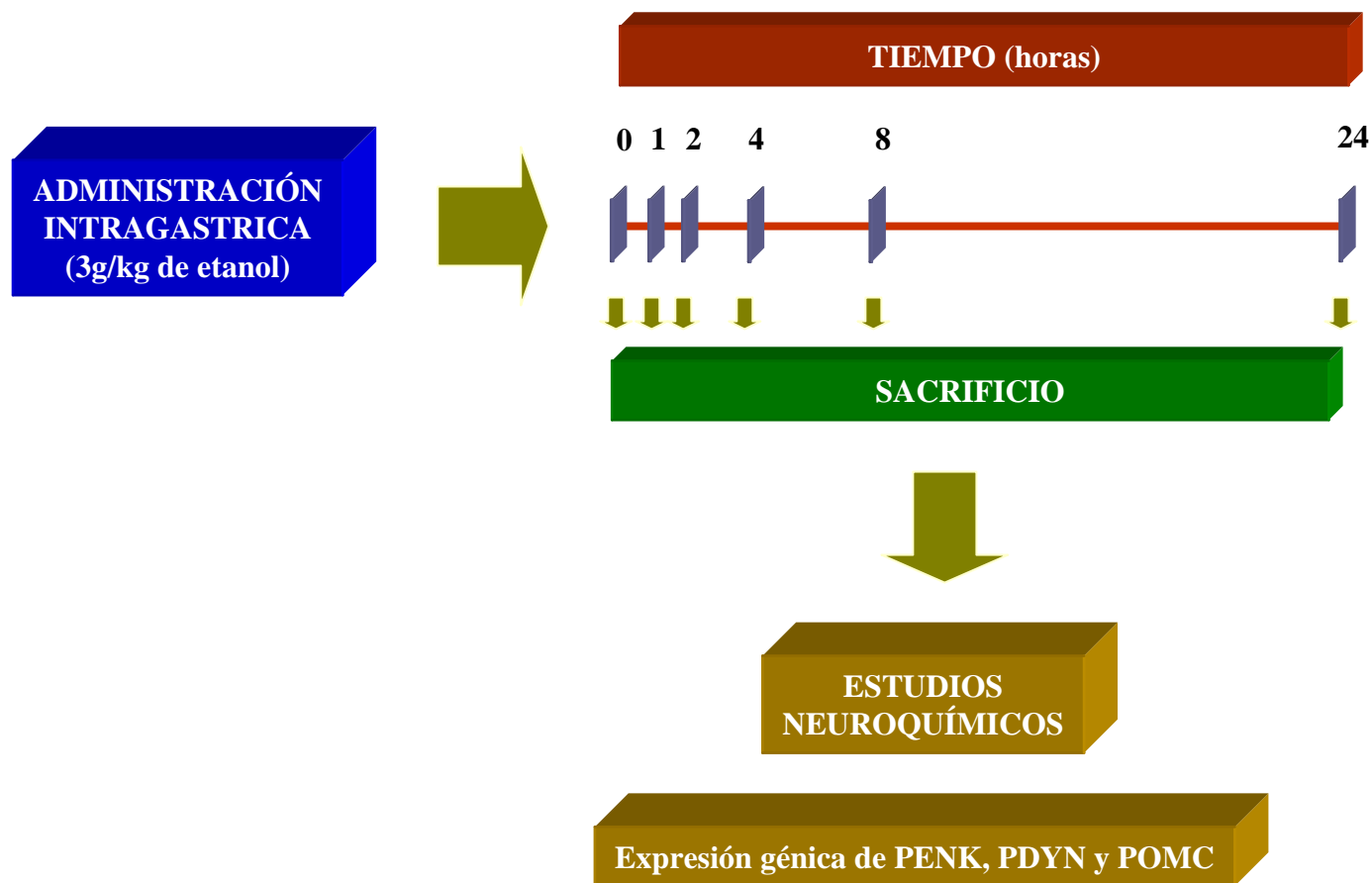
Solamente se compararon secciones que habían sido hibridadas y lavadas conjuntamente y expuestas a la misma película autorradiográfica.

## **6. Procedimientos experimentales.**

### ***6.1. Estudio curso temporal de los efectos de la administración aguda de etanol en ratas Wistar.***

Se administró una dosis intra-gástrica única a las ratas de 3 g/kg etanol al igual que sus controles el equivalente en volumen del vehículo utilizado (agua)(Figura M-3). Tras la administración del etanol los animales fueron sacrificados por decapitación a 1, 2, 4, 8 y 24

**FIGURA M-3**  
**ESTUDIO CURSO TEMPORAL DE LAS ALTERACIONES NEUROQUÍMICAS**  
**PRODUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ETANOL**



horas y sus cerebros e hipófisis rápidamente extraídos, congelados y almacenados a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### ***6.2. Estudio de los efectos neuroquímicos del consumo crónico y forzado de etanol en ratas Wistar.***

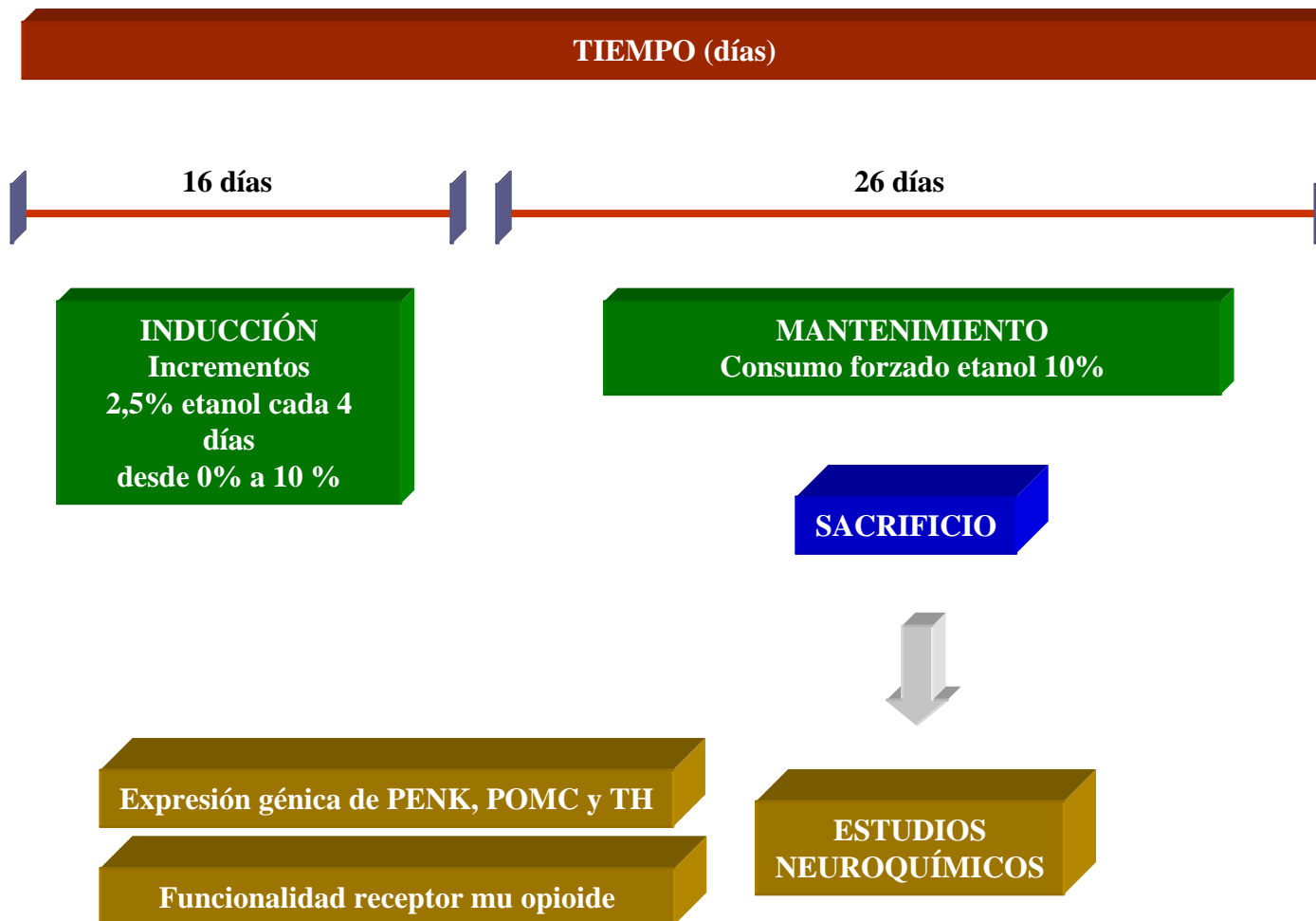
Para el desarrollo de este estudio crónico se utilizó un modelo animal de consumo forzado de etanol con acceso continuo durante 24 horas al día con comida *ad libitum*. Este método permite obtener volúmenes de ingesta de etanol superiores al método preferencial y estudiar así los efectos farmacológicos producidos por la droga sin que interfiera en los resultados la conducta de consumo del animal.

Los animales del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo experimental de consumo forzado de etanol (Figura M-4). En una primera fase, se sometió al grupo experimental a un proceso de inducción de la conducta de ingestión de la droga que consistía en ir incrementando el porcentaje de etanol en la bebida desde 0 %, 2,5 %, 5 % hasta 10 % a la vez que ir disminuyendo la concentración de sacarina desde 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % hasta 0,075 % en periodos de 5 días. Esta fase se llevó a cabo para evitar los efectos adversos ocasionados por la ingesta de etanol a porcentajes altos. Los animales controles también fueron sometidos a la misma reducción de sacarina de sus bebidas desde el 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % hasta el 0,075 %.

Una vez finalizada la fase de inducción comenzó la fase de mantenimiento. En esta fase de mantenimiento el grupo de animales de consumo forzado de etanol tuvo acceso continuo a un 10% de etanol en una solución de 0,075 % de sacarina durante 26 días tomando como referencia para finalizar el experimento el consumo estable de etanol ( $\text{SEM} \pm 1 \text{ SD}$ ) durante los 5 días anteriores a la finalización del experimento.

Por último, los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros e hipófisis extraídos, congelados y almacenados hasta su procesamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**FIGURA M-4**  
**ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROQUÍMICOS DEL CONSUMO CRÓNICO Y FORZADO DE ETANOL**





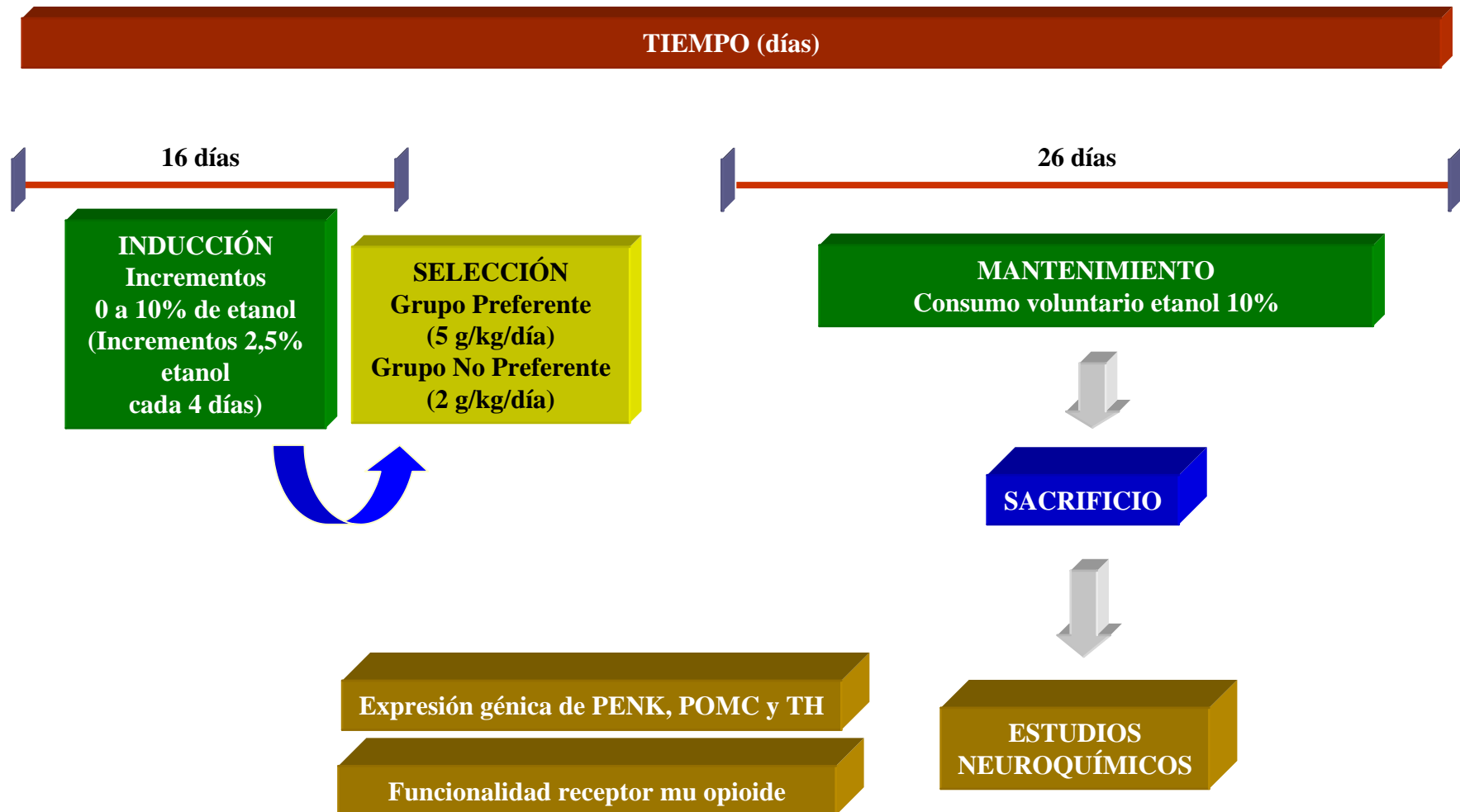
### ***6.3. Efecto de la conducta preferente de consumo en las alteraciones neuroquímicas causadas por el consumo crónico voluntario de etanol en ratas Wistar.***

Para el desarrollo de este estudio crónico se utilizó un modelo animal de preferencia de consumo de etanol con un patrón de acceso continuo (acceso al etanol durante 24 horas al día). Este método permite al animal elegir libremente la ingesta de agua o etanol a distintas concentraciones utilizando dos botellas y con comida *ad libitum*. (ver Modelos animales de autoadministración en Introducción).

Los animales del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo experimental de consumo de etanol (Figura M-5). En una primera fase, se sometió al grupo experimental a un proceso de inducción de la conducta de ingestión de etanol que consistía en ir incrementando el porcentaje de etanol en la bebida desde 0 %, 2,5 %, 5% hasta 10 % a la vez que ir disminuyendo la concentración de sacarina desde 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % hasta 0,075 % en periodos de 5 días. Los animales controles también fueron sometidos a la misma reducción de sacarina de sus bebidas desde el 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % hasta el 0,075%.

Una vez finalizada la fase de inducción comenzó la fase de mantenimiento. En esta fase se seleccionaron los animales en dos grupos según el consumo de etanol durante la fase de inducción (Figura M-5). Aquellos animales con un consumo mayor o igual a 5 g/kg/día conformaron el grupo preferente (P) y los animales con niveles de ingesta de etanol de menos de 1,5 g/kg/día formaron parte del grupo no preferente (NP). Un tercer grupo fue el formado por los animales controles que solo tenían acceso a agua. Esta fase de mantenimiento se extendió durante 26 días en los que los grupos P y NP tuvieron acceso continuo a un 10% de etanol en una solución de 0,075 % de sacarina y finalizó cuando los consumos de etanol de los animales P fueron estables ( $SEM \pm 1 SD$ ) durante los 5 días anteriores a la finalización del experimento.

**FIGURA M-5**  
**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES NEUROQUÍMICAS DEL CONSUMO**  
**CRÓNICO VOLUNTARIO DE ETANOL EN RATAS WISTAR**



Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros e hipófisis extraídos, congelados y almacenados hasta su posterior procesamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### ***6.4 Estudio de los marcadores neuroquímicos implicados en la vulnerabilidad por el consumo de etanol. Estudio comparativo entre ratas Wistar y Fawn-Hooded.***

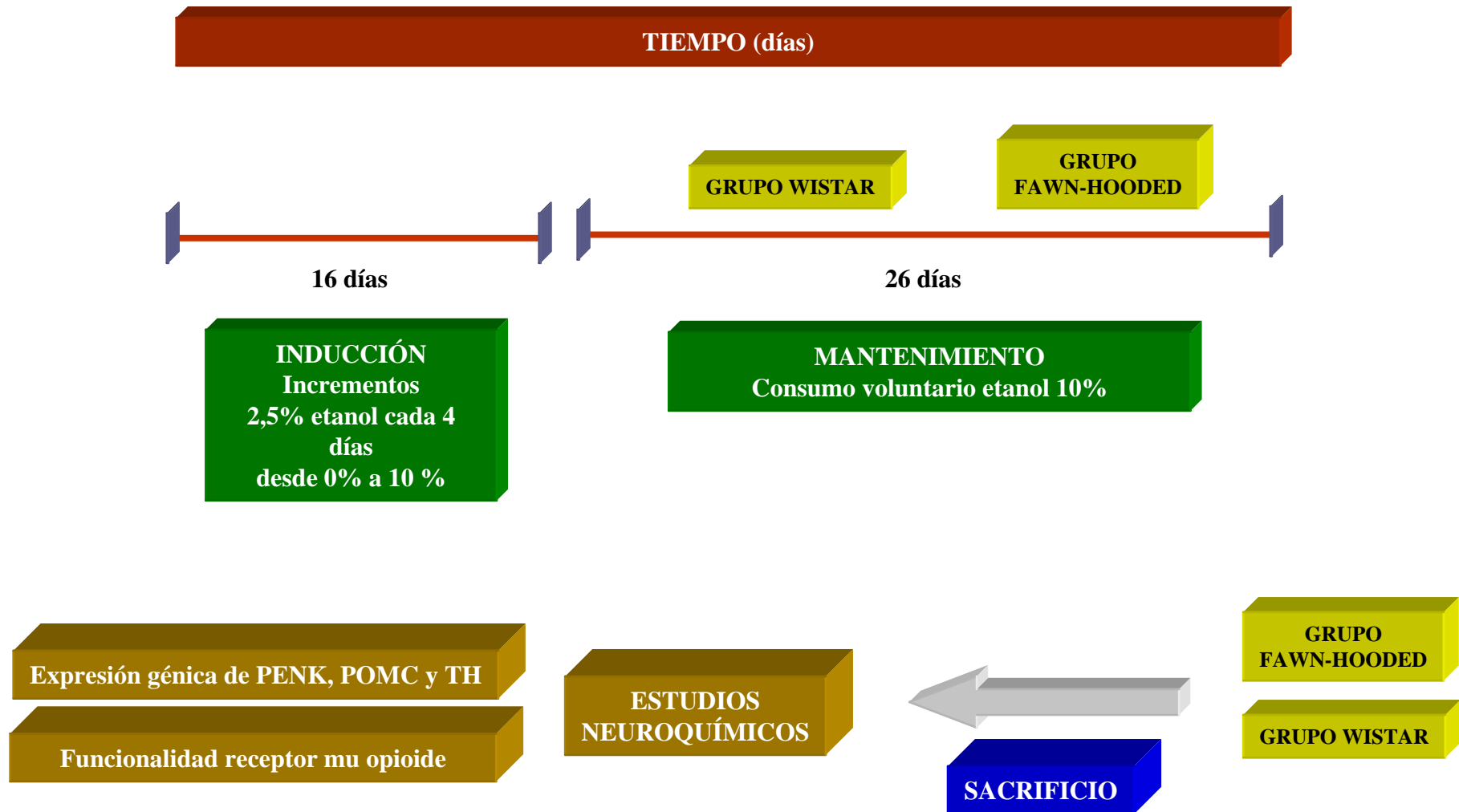
Para el estudio comparativo de la vulnerabilidad por el consumo de etanol en ratas Wistar y Fawn-Hooded se enfrentó a los animales al consumo voluntario de etanol utilizando el modelo preferencial de consumo continuo de la droga y comida *ad libitum* (ver Modelos animales de autoadministración en Introducción) pudiendo determinar así el patrón de conducta que muestran ambas razas de roedores en su preferencia natural por el consumo de etanol.

Los animales del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo de ratas Wistar y un grupo experimental de ratas Fawn-Hooded (Figura M-6). En una primera fase, se sometió a ambos grupos experimental a un proceso de inducción de la conducta de ingestión de etanol que consistía en ir incrementando el porcentaje de etanol en la bebida de 0 %, 2,5 %, 5 % a 10% en períodos de 4 días, mientras que el grupo control solo recibía agua como bebida.

Una vez finalizada la fase de inducción comenzó la fase de mantenimiento. En esta fase de mantenimiento ambos grupos de animales tuvieron acceso voluntario y continuo de un 10% de etanol durante 26 días tomando como referencia para finalizar el experimento el consumo estable de etanol ( $\text{media} \pm 1$  desviación estándar) durante los 5 días anteriores a la finalización del experimento.

Para determinar las diferencias basales, sin consumo previo de etanol, entre ambas razas después de ver sus patrones de consumo se tomó un grupo de ratas Wistar y otro grupo Fawn-Hooded natural y se sacrificaron por decapitación. Los cerebros e

**FIGURA M-6**  
**ESTUDIO DE LOS MARCADORES NEUROQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA**  
**VULNERABILIDAD POR EL CONSUMO DE ETANOL. ESTUDIO**  
**COMPARATIVO ENTRE RATAS WISTAR Y FAWN-HOODED**



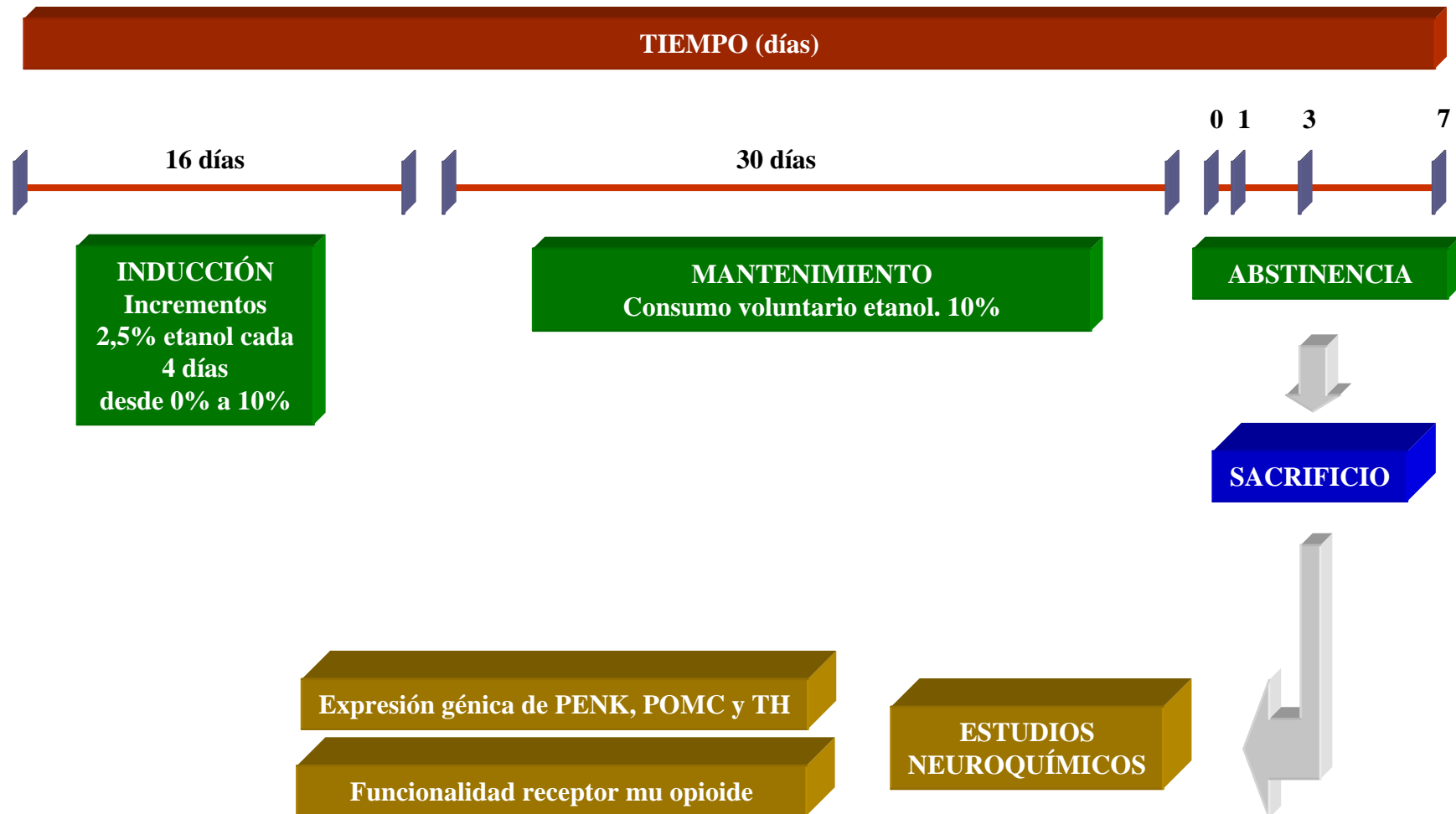
hipófisis extraídos fueron congelados y almacenados hasta su posterior procesamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

***6.5. Estudio curso temporal de las alteraciones neuroadaptativas inducidas por la abstinencia voluntaria a etanol en ratas Fawn-Hooded.***

Para el desarrollo de este estudio de abstinencia se utilizó un modelo animal de preferencia de consumo de etanol con un patrón de acceso continuo y comida *ad libitum*. (ver Modelos animales de autoadministración en Introducción).

El estudio de abstinencia consta de tres fases, inducción, mantenimiento y retirada de etanol (Figura M-7). Para ello, los animales del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo experimental de consumo de etanol. En la primera fase, se sometió al grupo de etanol a un proceso de inducción de la conducta de ingestión de etanol que consistía en ir incrementando el porcentaje de droga en la bebida desde un 0 %, 2,5 %, 5 % hasta el 10% en periodos de 4 días, mientras que el grupo control solo recibía agua como bebida. Una vez concluidos los 16 días de inducción se seleccionaron los animales de mayor consumo de etanol ( $>5\text{ g/kg/día}$ ) para comenzar con ellos la fase de mantenimiento del experimento. La fase de mantenimiento se extendió durante 30 días en los que el grupo experimental tuvo acceso continuo a un 10% de etanol. Tras concluir los 30 días de mantenimiento, se retiró el etanol a los animales subdividiendo el grupo experimental en tres grupos que se sacrificarían tras 1, 3 o 7 días de abstinencia de etanol conformando así la tercera y última fase llamada de abstinencia. A cada tiempo predeterminado durante la fase de abstinencia, los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros e hipófisis extraídos, congelados y almacenados hasta su procesamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**FIGURA M-7**  
**ESTUDIO CURSO TEMPORAL DE LAS ALTERACIONES**  
**NEUROADAPTATIVAS INDUCIDAS POR LA ABSTINENCIA VOLUNTARIA**  
**A ETANOL EN RATAS FAWN-HOODED**



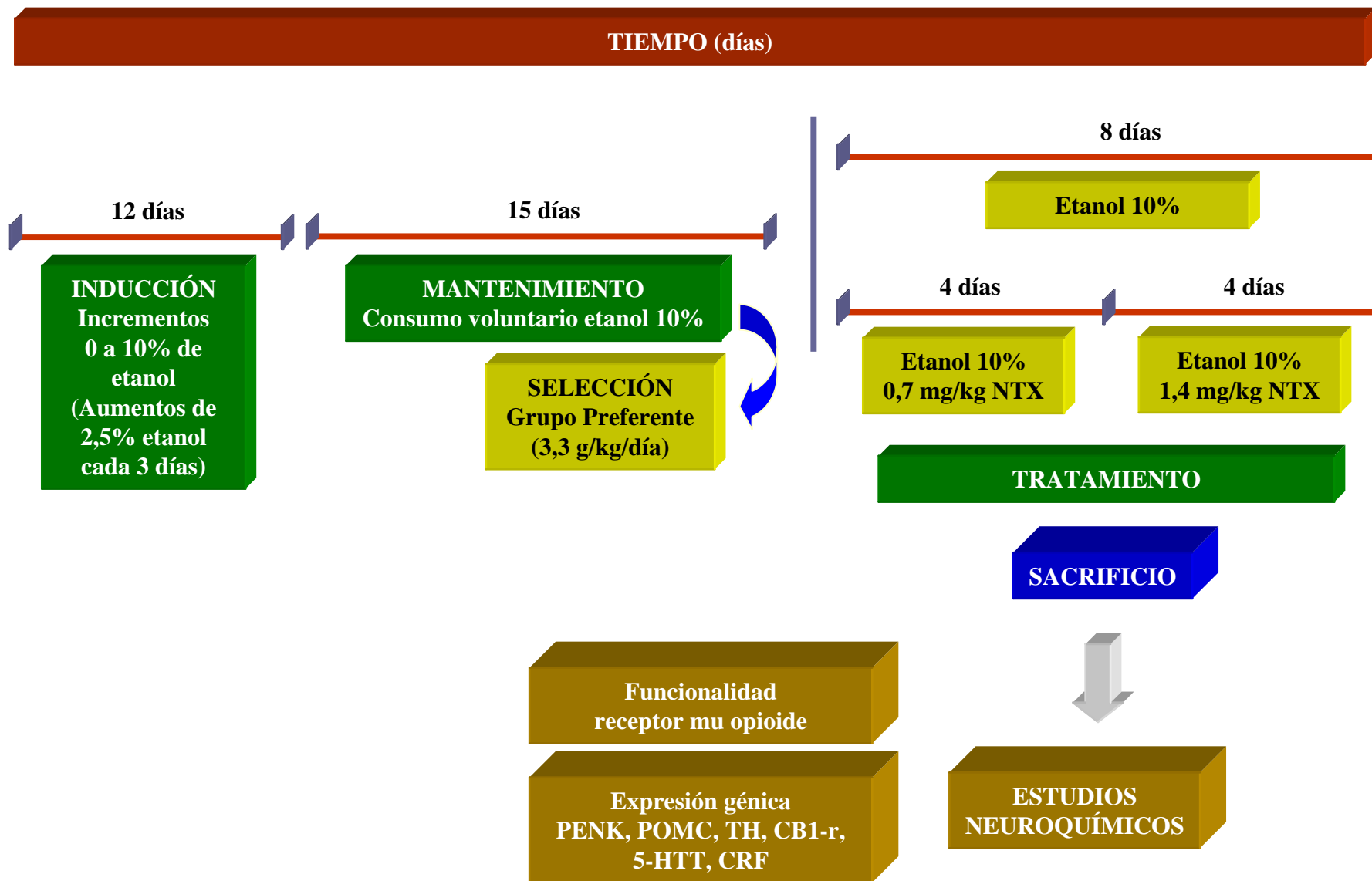
### **6.6. Evaluación de la naltrexona en el consumo crónico preferente de etanol en ratas Wistar.**

La evaluación de la naltrexona como tratamiento del alcoholismo se estudio desarrollando un modelo animal de preferencia de consumo de etanol con un patrón de acceso continuo y comida *ad libitum*. (ver Modelos animales de autoadministración en Introducción).

El estudio para evaluar el tratamiento con naltrexona constó de tres fases, inducción, mantenimiento de etanol y tratamiento con naltrexona (Figura M-8). Para ello, los animales del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo control y un grupo experimental de consumo de etanol. En la primera fase, se sometió al grupo experimental a un proceso de inducción de la conducta de ingestión de etanol que consistía en ir incrementando el porcentaje de etanol en la bebida desde un 0 %, 2,5 %, 5% hasta el 10% en periodos de 4 días, mientras que el grupo control solo recibía agua como bebida. Para seleccionar los animales tomamos como referencia la ingesta de etanol de la fase de inducción de forma que aquellos animales con un consumo de la droga >3,5 g/kg/día pasaban a la siguiente fase del experimento.

Finalizada la fase de inducción, comenzó la fase de mantenimiento que se extendió durante 15 días con acceso voluntario y continuo a un 10% de etanol. Tras los 15 días de mantenimiento, se procedió a tratar a los animales con naltrexona y para ello se subdividió el grupo experimental de consumo de etanol en dos. Un primer grupo de animales fueron tratados con 0,7 g/kg naltrexona (4 días) y de 1,4 g/kg de naltrexona (4 días) para evaluar el efecto de la naltrexona sobre la conducta de ingestión de etanol y el otro grupo se mantuvo sin variaciones durante los 8 días (con acceso al etanol como en la fase de mantenimiento). Al finalizar los 8 días se sacrificaron los animales de ambos grupos por decapitación y sus cerebros e hipófisis extraídos, congelados y almacenados hasta su procesamiento a -80° C.

**FIGURA M-8**  
**EVALUACIÓN DE LA NALTREXONA EN EL CONSUMO CRÓNICO PREFERENTE**  
**DE ETANOL EN RATAS WISTAR**





## **7. Métodos estadísticos.**

Los resultados representados son la media aritmética  $\pm$  el error estándar (de las medidas de cada grupo experimental y se ha representado considerando la media del grupo control como el 100%. La significación estadística de las diferencias entre los distintos grupos experimentales fue determinada utilizando el programa de análisis estadístico SigmaStat. Se ha utilizado el test *t*-Student y el análisis de la varianza de una vía y de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Newman-Keuls cuando se comparasen dos o más grupos según el diseño experimental. Las diferencias halladas se consideraron significativas si la probabilidad de error era menor del 5 %.

## ***Resultados***

### **1.- Curso temporal de los efectos de la administración aguda de etanol en ratas Wistar. Alteraciones en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa.**

En la figura (Figura R-1) se puede comprobar el efecto de la administración aguda de 3 g/Kg de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra y el área ventral tegmental. La administración aguda de etanol produce una respuesta similar en relación a la expresión génica de tirosina hidroxilasa, observada tras la realización del análisis de la varianza de una vía (ANOVA), en la sustancia nigra y el área ventral tegmental. Los datos demuestran que existe un incremento significativo en los niveles de ARNm a 1 h

en la sustancia nigra [**1 h (48%)**,  $F(5,40)=8,27$ ;  $P<0,001$ ] y a 1h y 2h en el área ventral tegmental [**1 h (50%)**,  $F(5,39)=8,47$ ;  $P<0,001$ ; **2 h (25%)**,  $F(5,39)=4,04$ ;  $P=0,019$ ]. En la Figura R-1 también podemos ver unos autorradiogramas representativos que muestran como la administración aguda de etanol aumenta las densidades ópticas encontradas en las estructuras previamente citadas.

En las figuras (Figura R-2, R-3, R-4) se observa el efecto de la administración aguda de 3 g/Kg de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo caudado-putamen, núcleo accumbens central y periférico, el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo ventromedial del hipotálamo, la amígdala central y el núcleo amigdalóide central.

Las comparaciones después del ANOVA realizado (Figura R-2) revelaron incrementos en la expresión génica de proencefalina estadísticamente significativos desde 2 h hasta las 24 h en el núcleo caudado-putamen [**2 h (57%)**,  $F(5,41)=9,63$ ;  $P<0,001$ ; **4 h (48%)**,  $F(5,41)=7,17$ ;  $P<0,001$ ; **8 h (23%)**,  $F(5,41)=3,96$ ;  $P=0,022$ ; **24 h (41%)**,  $F(5,41)=6,44$ ;  $P<0,001$ ] y en el núcleo accumbens central [**2 h (70%)**,  $F(5,39)=10,55$ ;  $P<0,001$ ; **4 h (60%)**,  $F(5,39)=8,35$ ;  $P<0,001$ ; **8 h (32%)**,  $F(5,39)=4,99$ ;  $P=0,003$ ; **24 h (54%)**,  $F(5,39)=7,49$ ;  $P<0,001$ ] y a **2 h (31%)** [ $F(5,40)=5,28$ ;  $P=0,004$ ] sin embargo solo encontramos diferencias a **4 h (32%)** [ $F(5,40)=4,92$ ;  $P=0,011$ ] en el núcleo accumbens periférico y a **2 h** en el tubérculo olfatorio (**37%**) [ $F(5,42)=12,46$ ;  $P<0,001$ ] y la corteza piriforme (**15%**) [ $F(5,46)=25,90$ ;  $P<0,001$ ]. En la Figura R-4 se puede comprobar gráficamente como la administración aguda de etanol aumenta las densidades ópticas encontradas en las estructuras analizadas.

Con respecto a la expresión génica de proencefalina en la amígdala central y el complejo amigdalino (Figura R-3), los resultados también mostraron diferencias de expresión en ambos núcleos. Así, encontramos un aumento de expresión génica de proencefalina en la amígdala central a **2 h (21%)** [ $F(5,46)=6,05$ ;  $P<0,001$ ], **4 h (47%)**, [ $F(5,46)=13,70$ ;  $P<0,001$ ], **8 h (31%)** [ $F(5,46)=8,93$ ;  $P=0,022$ ], **24 h (16%)** [ $F(5,46)=4,75$ ;

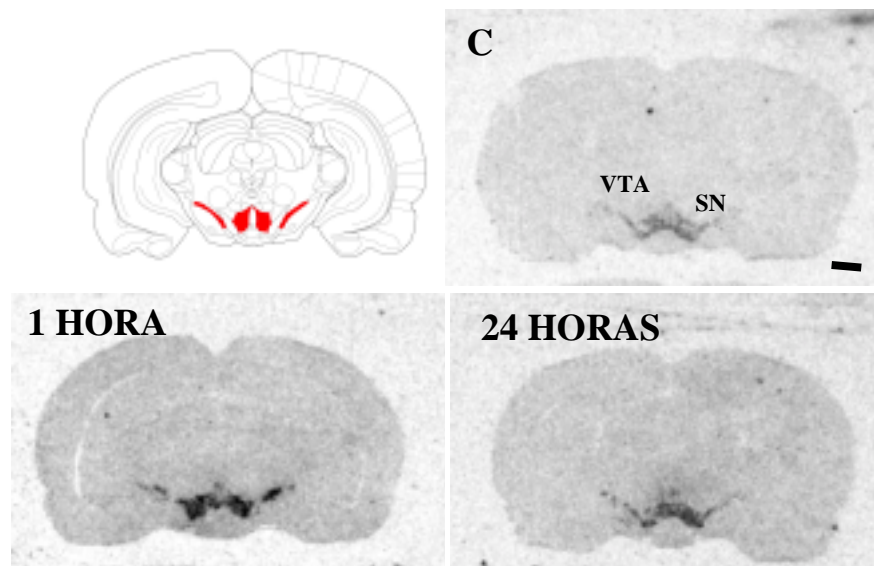
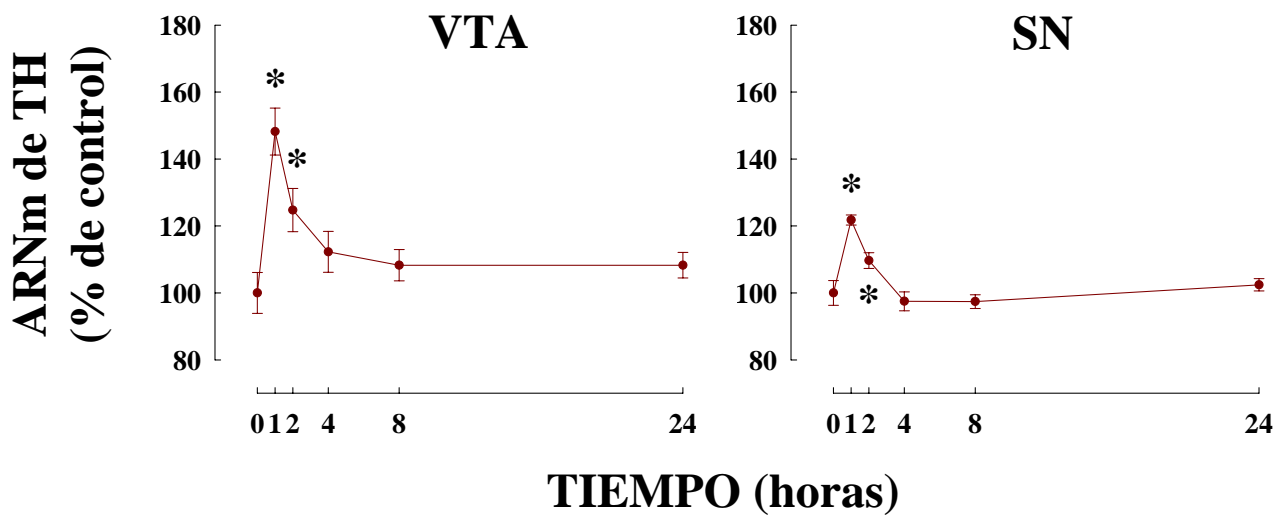
$P=0,005$ ]] y un incremento de los niveles de proencefalina en el complejo amigdalino a **4h (27%)** [ $F(5,46)=7,44$ ;  $P<0,001$ ]]. En la Figura R-4 se muestran unos autorradiogramas representativos del efecto que tiene la administración aguda de etanol sobre las densidades ópticas encontradas tanto en la amígdala central como en el complejo amigdalino.

Las últimas regiones estudiadas fueron el núcleo paraventricular del hipotálamo y el núcleo ventromedial del hipotálamo (Figura R-3). En estas regiones y tras la administración aguda de etanol se produjeron incrementos significativos de la expresión génica de proencefalina. Por una parte encontramos las diferencias a **4 h (82%)** [ $F(5,46)=13,45$ ;  $P<0,001$ ], **8 h (31%)** [ $F(5,46)=5,03$ ;  $P=0,005$ ] y **24 h (36%)** [ $F(5,46)=5,84$ ;  $P=0,002$ ] en el núcleo paraventricular del hipotálamo y por la otra a **1 h (10%)** [ $F(5,46)=9,40$ ;  $P<0,001$ ], **2 h (27%)** [ $F(5,46)=26,15$ ;  $P<0,001$ ], **4 h (15%)** [ $F(5,46)=14,62$ ;  $P<0,001$ ] y **8 h (12%)** [ $F(5,46)=11,94$ ;  $P<0,001$ ] en el núcleo ventromedial del hipotálamo. En la Figura R-4 se muestran autorradiogramas representativos del efecto que tiene la administración aguda de etanol sobre las densidades ópticas encontradas tanto en el núcleo paraventricular del hipotálamo como en el núcleo ventromedial del hipotálamo.

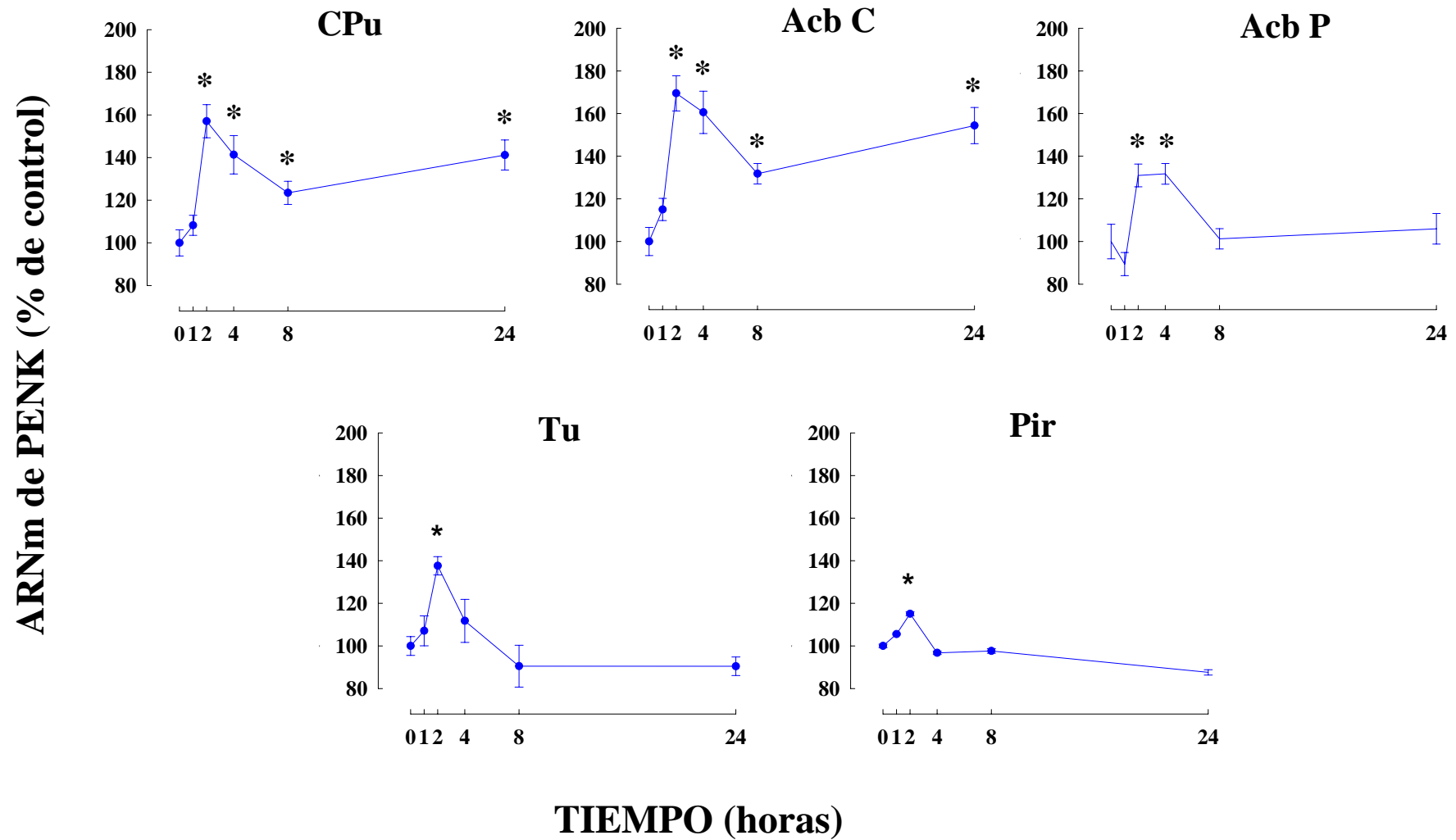
En la figura R-5, observamos el efecto que tiene la administración aguda de 3g/Kg de etanol a los distintos tiempos en los que se realizaron medidas de la expresión génica de prodinorfina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central y periférico, núcleo paraventricular del hipotálamo y núcleo supraóptico. En el PVN como en el SON se producen incrementos estadísticamente significativos con respecto al control a las **2 h** un **27%** [ $F(6,49)=7,22$ ;  $P=0,018$ ] en el núcleo paraventricular del hipotálamo, un **24%** [ $F(6,49)=5,39$ ;  $P=0,009$ ] en el núcleo supraóptico y un **15%** [ $F(5,42)=4,10$ ;  $P=0,010$ ] en el núcleo caudado-putamen, así como a las **4 h** de un **23%** [ $F(6,49)=7,22$ ;  $P=0,037$ ], un **21%** [ $F(6,49)=5,39$ ;  $P=0,011$ ] en el núcleo supraóptico y un **32%** [ $F(5,42)=8,50$ ;  $P<0,001$ ] en el núcleo caudado-putamen tras la administración intra-gástrica del etanol. Las comparaciones después del ANOVA realizado (Figura R-5) revelaron incrementos en la

expresión génica de prodinorfina estadísticamente significativos desde **2 h** hasta las **24h** en el núcleo accumbens periférico [**2 h (19%)**,  $F(5,40)=6,20$ ;  $P<0,001$ ; **4 h (29%)**,  $F(5,40)=9,69$ ;  $P<0,001$ ; **8 h (31%)**,  $F(5,40)=9,89$ ;  $P<0,001$ ; **24 h (28%)**,  $F(5,40)=9,50$ ;  $P<0,001$ ] y de 2h a 8h en el núcleo accumbens central [**2 h (32%)**  $F(5,40)=10,23$ ;  $P<0,001$ ), **4 h (45%)**,  $F(5,40)=14,77$ ;  $P<0,001$ ) y **8 h (36%)**  $F(5,40)=11,30$ ;  $P<0,001$ ].

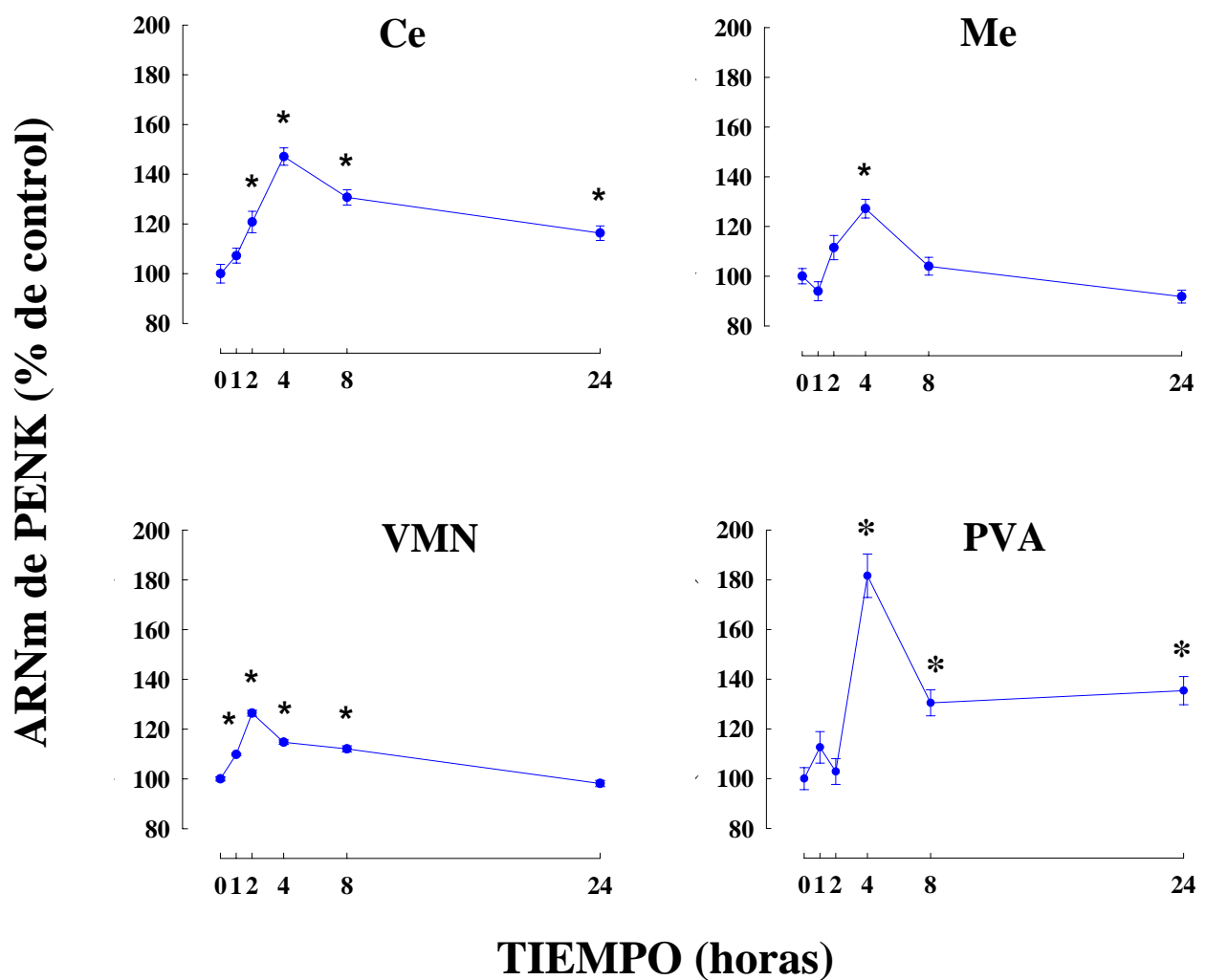
En la figura R-6 se muestra como en el núcleo arqueado se produce una disminución de la expresión de proopiomelanocortina apenas **1 h (16%)** [ $F(5,45)=4,27$ ;  $P=0,034$ ] y un aumento en el lóbulo anterior de la hipófisis a las **4 h (28%)** [ $F(5,41)=4,93$ ;  $P=0,011$ ] después de la administración de etanol (Figura R-7). Cuando se analiza la expresión génica de proopiomelanocortina en el lóbulo intermedio de la hipófisis (LI) se comprobó que existía una disminución de esta a **1 h (30%)** [ $F(5,36)=8,34$ ;  $P<0,001$ ], **2 h (25%)** [ $F(5,36)=6,82$ ;  $P<0,001$ ], **4 h (20%)** [ $F(5,36)=6,12$ ;  $P<0,001$ ], **8 h (20%)** [ $F(5,36)=5,64$ ;  $P=0,001$ ] y **24 h (18%)** [ $F(5,36)=5,47$ ;  $P<0,001$ ]. En la Figura R-6 y Figura R-7 se muestran las densidades ópticas encontradas y sus variaciones tras la administración aguda de etanol en unos autorradiogramas representativos de las regiones ensayadas.



**Figura R-1.** Efecto de la administración intra gástrica de 3 g/kg de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Los puntos representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de tirosina hidroxilasa en ambos núcleos durante el efecto agudo del etanol. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0.05$  respecto al grupo control. C, grupo control; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; TH, tirosina hidroxilasa.

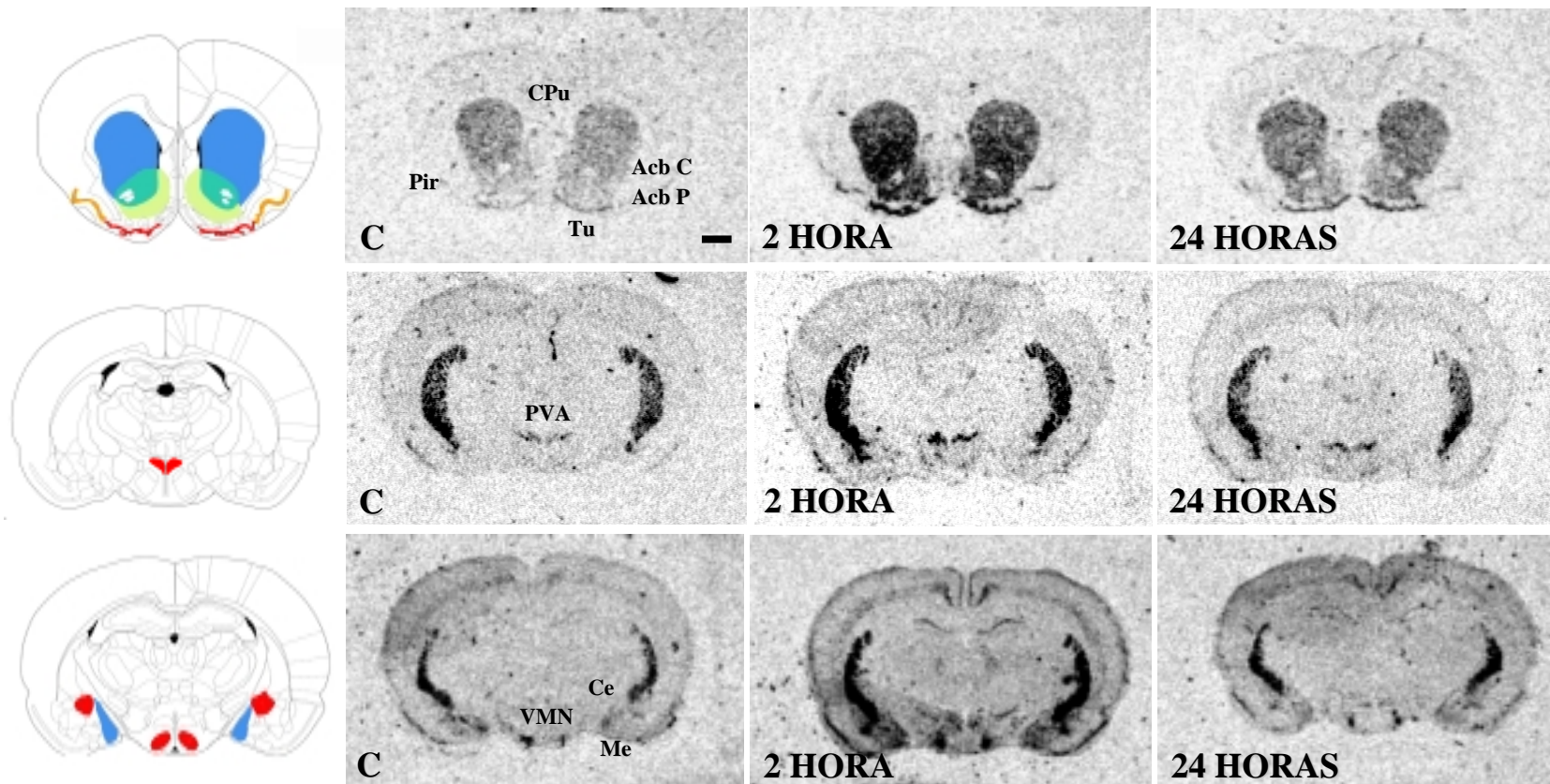


**Figura R-2.** Efecto de la administración aguda de 3 g/kg de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; PENK, proencefalina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.

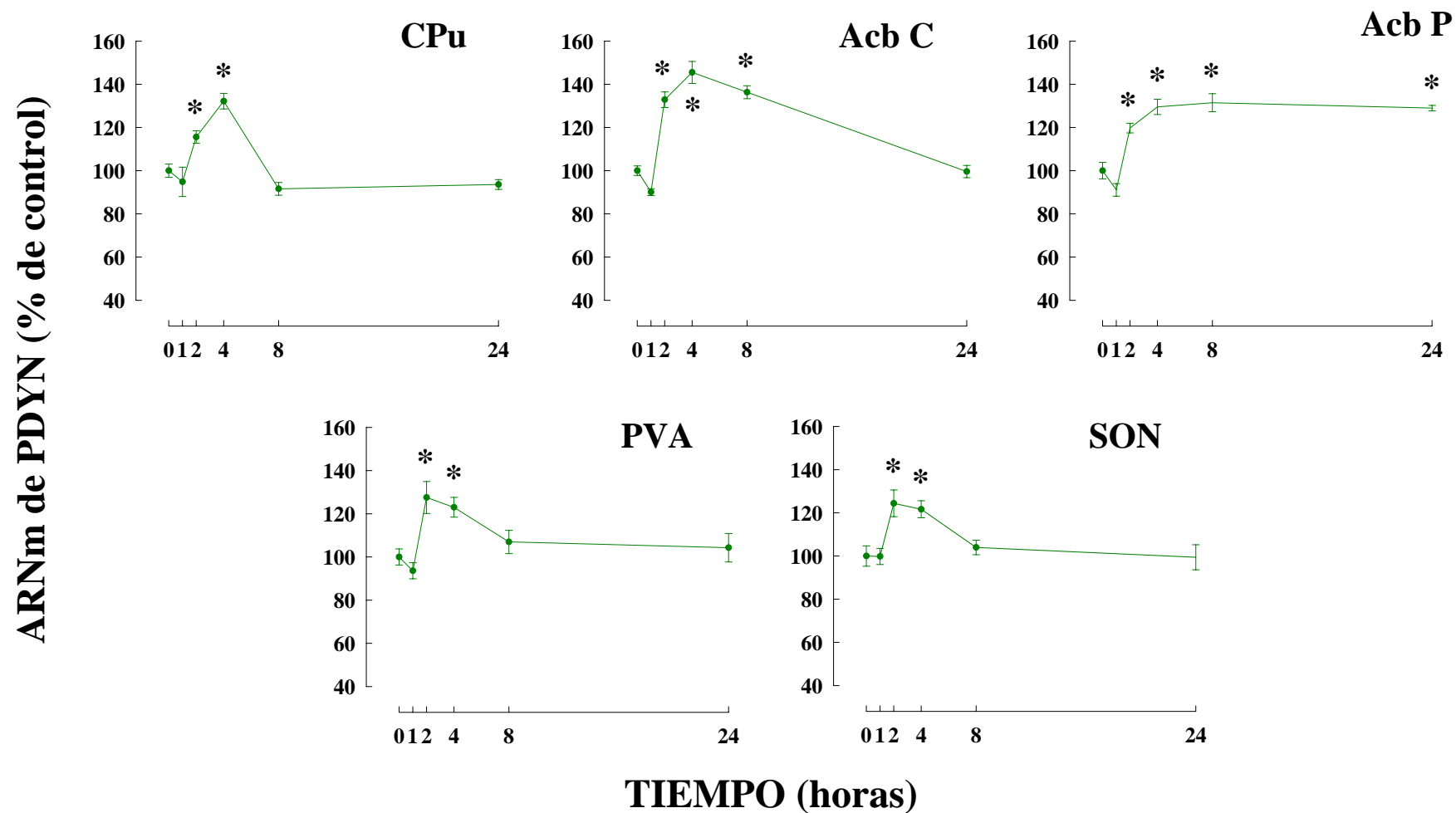


**Figura R-3.** Efecto de la administración aguda de 3 g/kg de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo ventromedial del hipotálamo, núcleo paraventricular del hipotálamo, amígdala central, amígdala basal. Los puntos representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; PENK, proencefalina; Ce, amígdala central; Me, amígdala basal; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo.

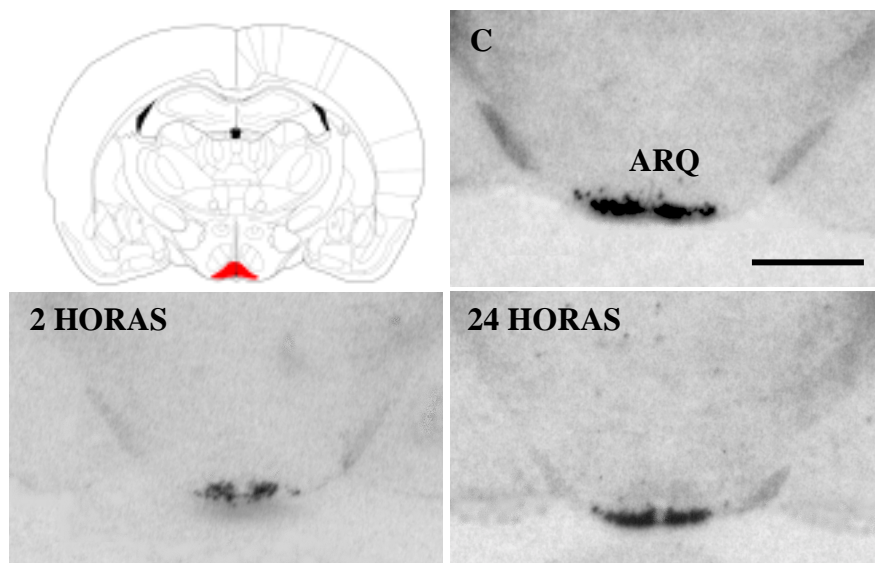
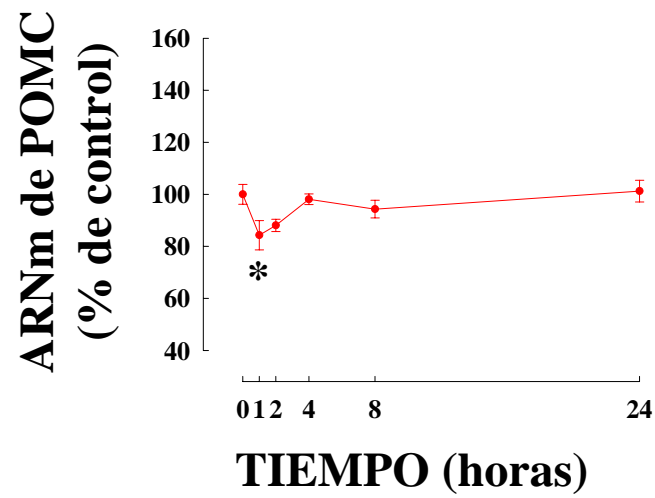




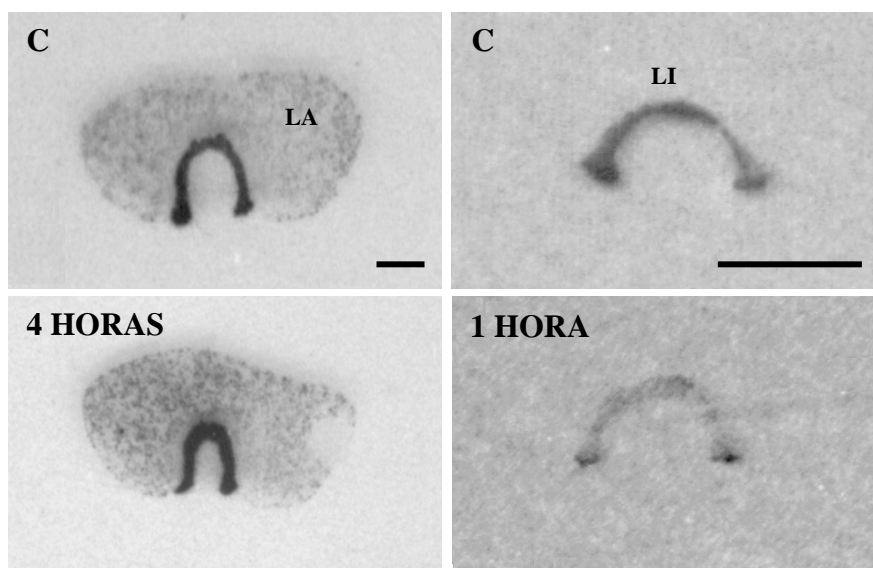
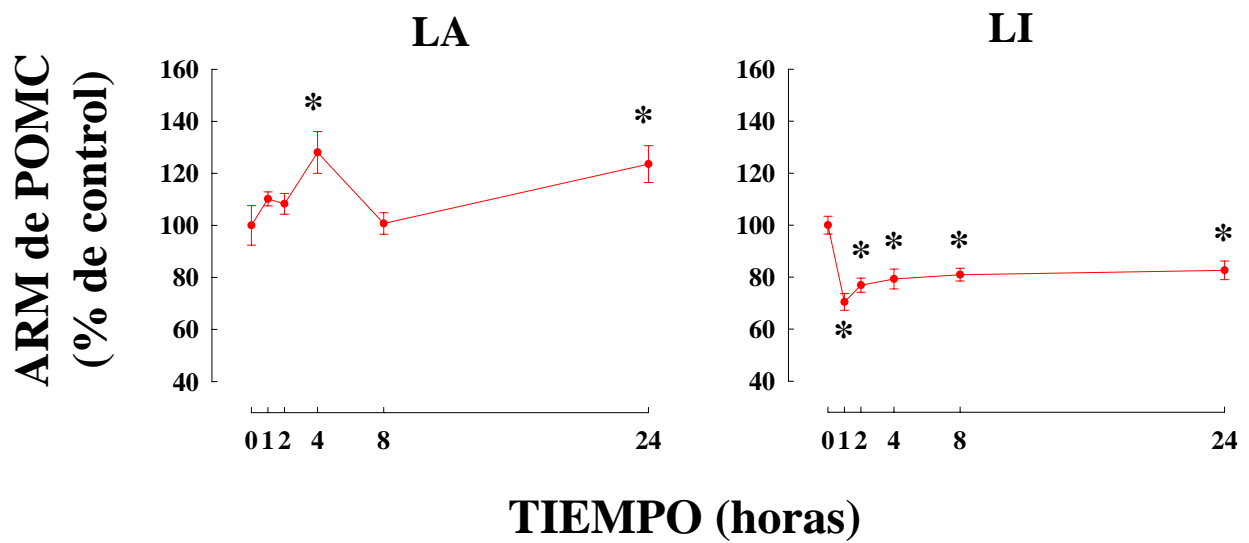
**Figura R-4.** Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de proencefalina a nivel de los núcleos ventromedial del hipotálamo, paraventricular del hipotálamo y caudado-putamen tras la administración aguda de 3 g/kg de etanol. Barra = 1 mm. C, grupo control; C-Pu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; Ce, amígdala central; Me, núcleo amigdalóide medial.



**Figura R-5.** Efecto de la administración aguda de 3 g/kg de etanol sobre la expresión génica de prodinorfina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, núcleo paraventricular del hipotálamo y núcleo supraóptico. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; PDYN, prodinorfina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; SON, núcleo supraóptico.



**Figura R-6.** Efecto de la administración aguda de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado. Las puntos representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1 mm. C, grupo control; POMC, proopiomelanocortina; ARQ, núcleo arqueado.



**Figura R-7.** Efecto de la administración aguda de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis y autorradiogramas representativos de las alteraciones encontradas en ambos núcleos. En las gráficas los puntos representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. En los autorradiogramas, barra = 1mm. C, grupo control; POMC, proopiomelanocortina; LA, lóbulo anterior de la hipófisis; LI, lóbulo intermedio de la hipófisis.

## 2. Estudio de los efectos neuroquímicos del consumo crónico y forzado de etanol en ratas Wistar.

### 2.1. Patrón de consumo.

En la Figura R-8 se muestra la evolución de la conducta de ingestión forzada de etanol durante todo el experimento. Como se puede observar existen dos partes bien definidas que constituyen ambas fases del experimento correspondientes a la inducción y mantenimiento de la conducta de ingestión. Durante la fase de inducción, el consumo de etanol se mantuvo constante en torno a los 7 g/kg/día y en la fase de mantenimiento de los animales en consumo forzado de etanol, la ingesta de la droga también se mantuvo constante en torno a los 5 g/kg/día.

### 2.2. Efectos del consumo forzado de etanol sobre la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa.

La ingesta crónica forzada de etanol disminuyó los niveles de ARNm de tirosina hidroxilasa significativamente en el grupo forzado frente al grupo control (Figura R-9). Así, encontramos una disminución del **26%** ( $t=5,569$ ;  $P<0,001$ ) en el área ventral tegmental y del **25%** ( $t=3,679$ ;  $P=0,003$ ) en la sustancia nigra. En la misma Figura también podemos ver unos autorradiogramas representativos del efecto que tiene el consumo crónico forzado de etanol sobre las densidades ópticas encontradas en ambos núcleos.

El consumo crónico forzado de etanol disminuyó claramente los niveles de proencefalina en el núcleo caudado-putamen (**34%**;  $t=8,407$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens central (**44%**,  $t=5,326$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens periférico (**38%**,  $t=5,259$ ;  $P<0,001$ ), el tubérculo olfatorio (**28%**,  $t=3,917$ ;  $P=0,002$ ), la amígdala central (**14%**,  $t=4,482$ ;  $P<0,001$ ) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (**13%**,  $t=4,028$ ;  $P=0,001$ ) (Figuras R-10 y R-11). Por otro lado, el consumo crónico forzado no tuvo incidencia en la expresión génica de proencefalina en la corteza piriforme e incrementó

significativamente los niveles de ARNm de proencefalina en el núcleo paraventricular del hipotálamo (**52%**,  $t=-7,987$ ;  $P<0,001$ )(Figuras R-10 y R-11).

En la Figura R-12 están representados los autorradiogramas que muestran las diferencias existentes en los niveles de ARNm de proencefalina en los distintos núcleos analizados.

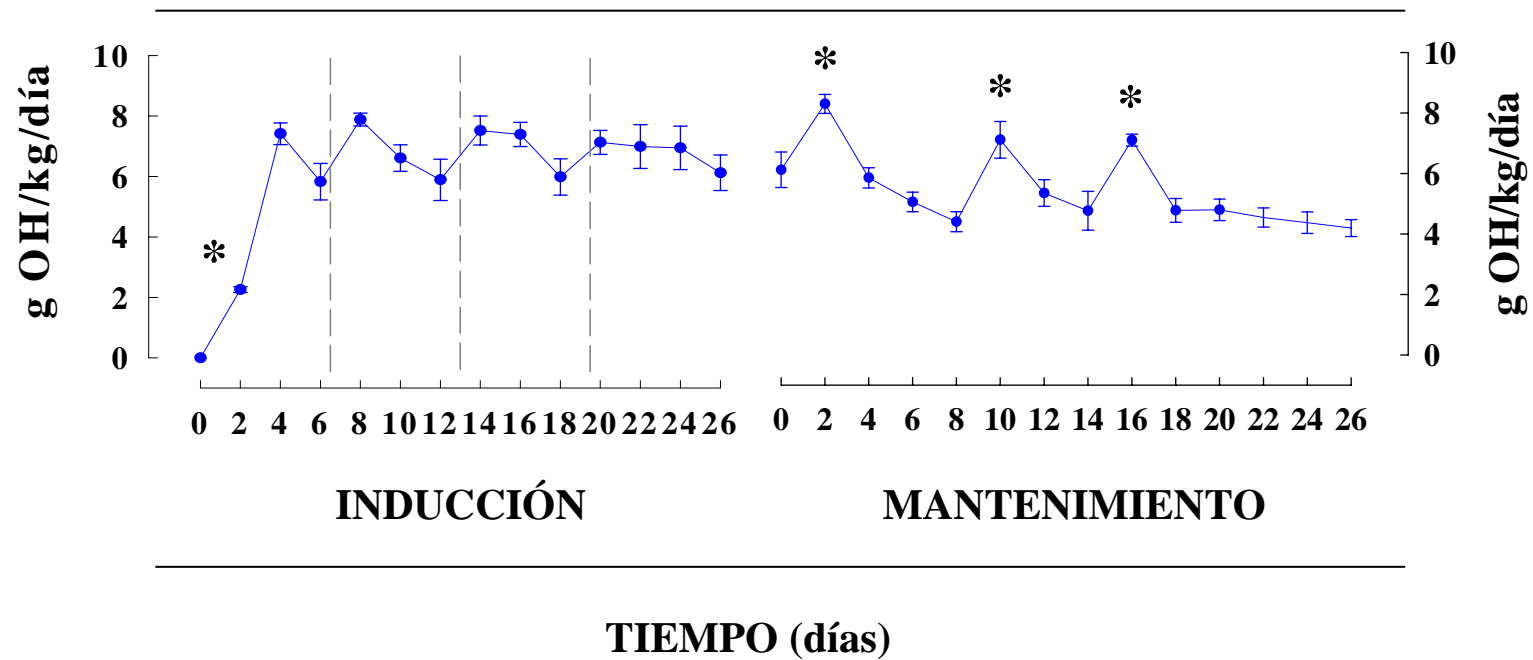
Como muestra la figura R-13, la ingesta crónica forzada de etanol produjo una disminución importante en el nivel de ARNm de prodinorfina en el núcleo caudado-putamen (**54%**,  $t=7,127$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens central (**63%**,  $t=11,438$ ;  $P<0,001$ ) y el núcleo accumbens periférico (**48%**,  $t=9,078$ ;  $P<0,001$ ). Además, el consumo crónico forzado de etanol aumentó los niveles de ARNm de prodinorfina en el núcleo paraventricular del hipotálamo (**48%**,  $t=-4,564$ ;  $P<0,001$ ) y el núcleo supraóptico (**15%**,  $t=-2,766$ ;  $P=0.016$ ).

Por lo que respecta a la proopiomelanocortina, en las Figura R-14 y R-15 podemos observar como en el núcleo arqueado se produce una disminución de la expresión del mensajero tras el consumo crónico forzado (**22%**,  $t=5,741$ ;  $P<0,001$ ) y en el lóbulo anterior de la hipófisis (**26%**,  $t=9,475$ ;  $P<0,001$ ). Por otro lado no hubo diferencias en el lóbulo intermedio de la hipófisis entre los animales control y los animales forzados al consumo de etanol.

Los resultados obtenidos sobre la expresión génica de proopiomelanocortina quedan claramente reflejados por las diferencias en la señal de hibridación entre el grupo control y el forzado en autorradiogramas de las Figuras R-14 y R-15.

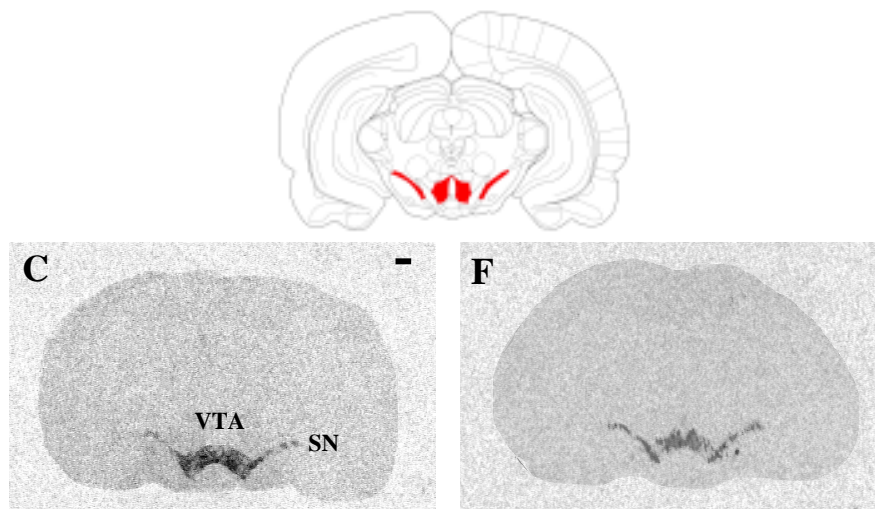
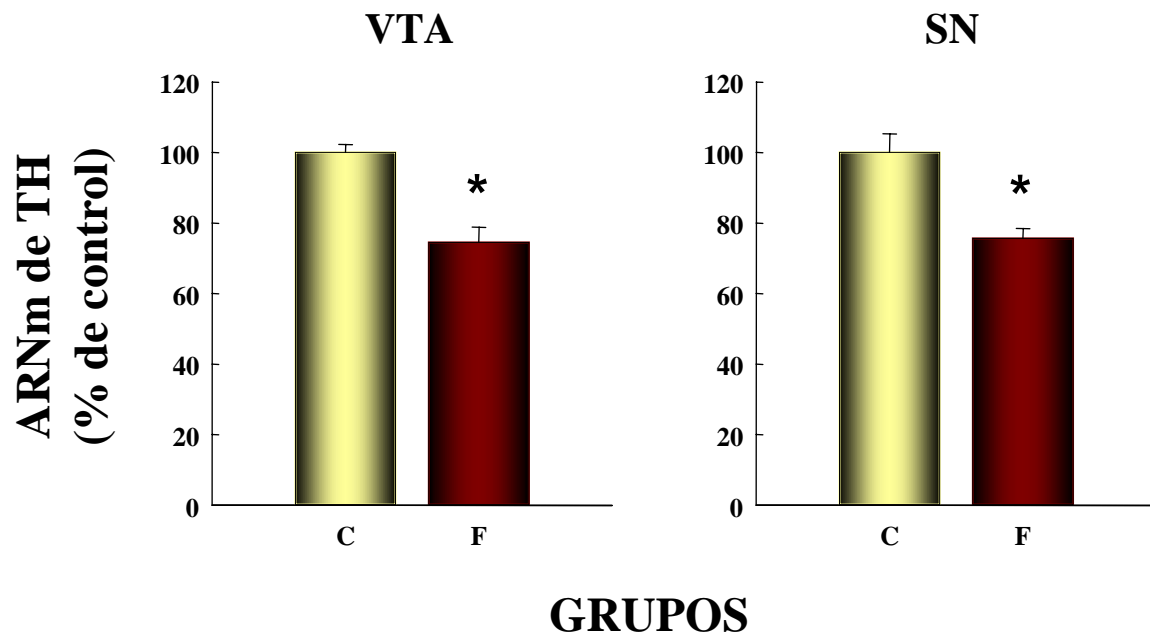
### ***2.3. Efectos del consumo de etanol forzado sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide.***

Como muestra la Figura R-16, al consumo crónico forzado de etanol durante 42 días disminuyó significativamente la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO en el grupo forzado frente al grupo control en un **43%** ( $t=2,356$ ;  $P=0,040$ ) en la corteza cingulada, en un **21%** ( $t=5,827$ ;  $P<0,001$ ) en el núcleo accumbens central, en un **26%** ( $t=4,033$ ;  $P=0,002$ ) en el núcleo accumbens periférico y en un **9%** ( $t=5,827$ ;  $P<0,001$ ) en el núcleo caudado-putamen. En la Figura R-16 se puede comprobar gráficamente las diferencias encontradas entre los grupos experimentales analizados.

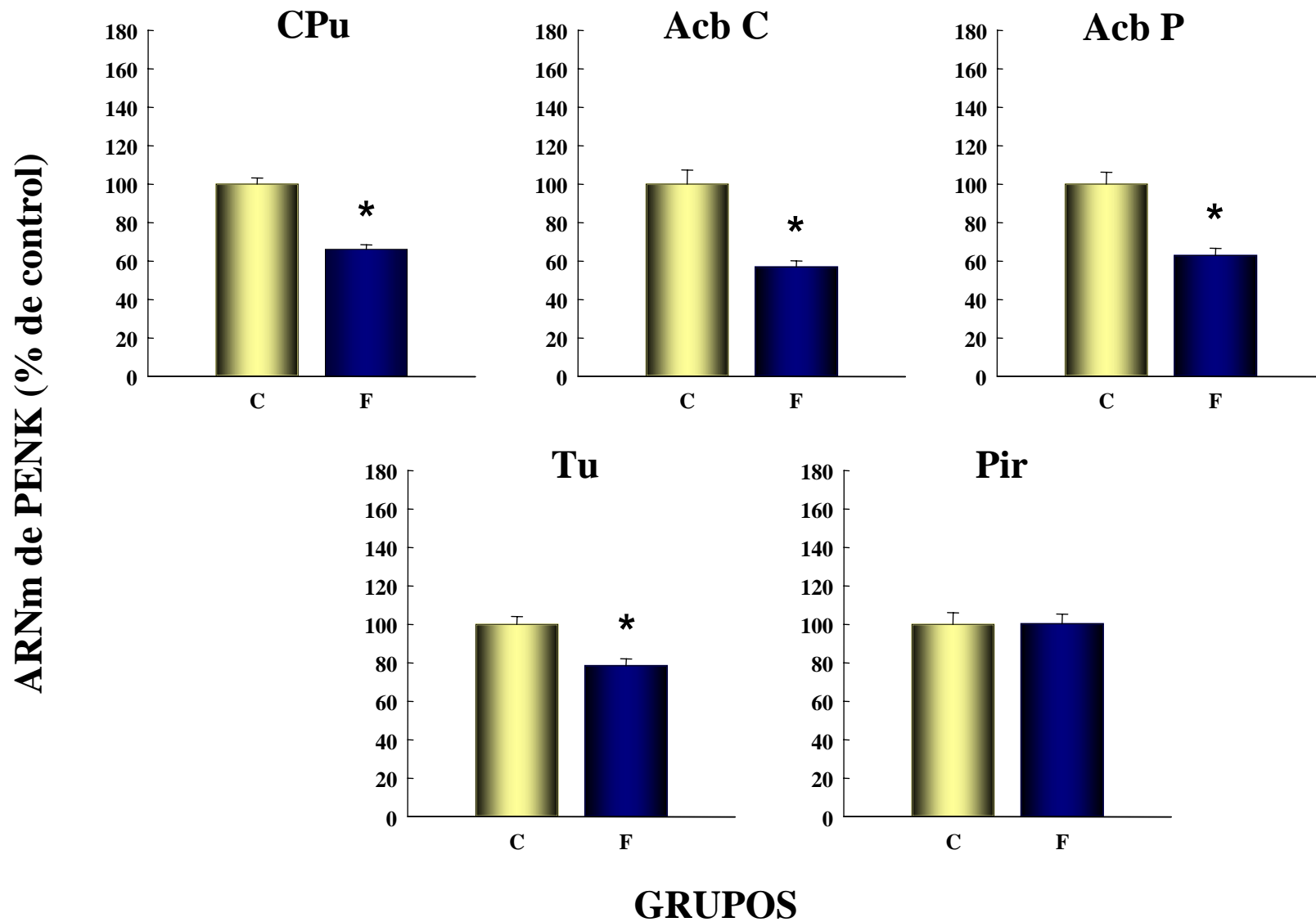


**Figura R-8.** Patrón de consumo forzado de etanol en ratas Wistar. Los puntos corresponden con la media  $\pm$  1 error estándar del consumo de la droga. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al resto de medias.

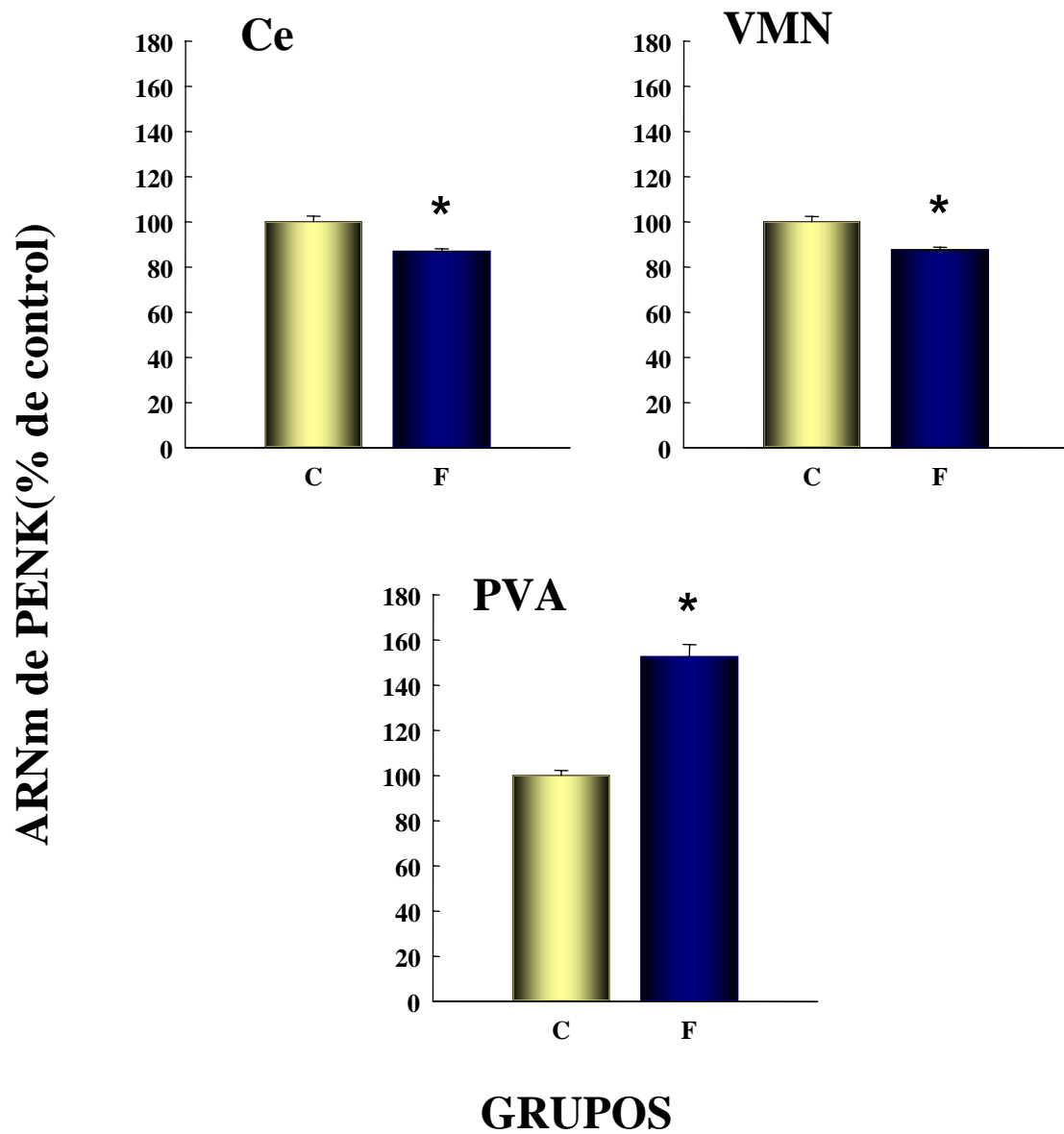




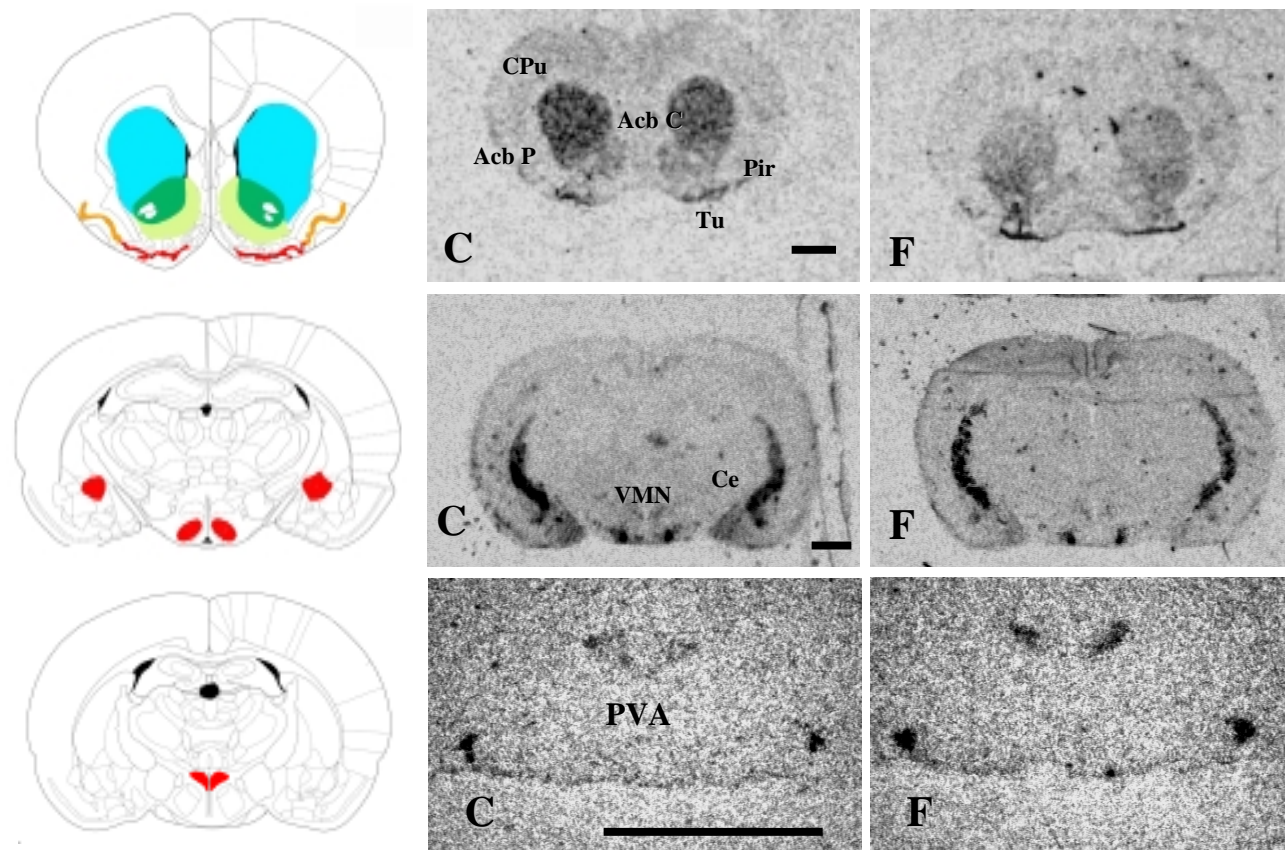
**Figura R-9.** Efecto de la ingesta crónica forzada de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de tirosina hidroxilasa tras el consumo de etanol. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; TH, tirosina hidroxilasa.



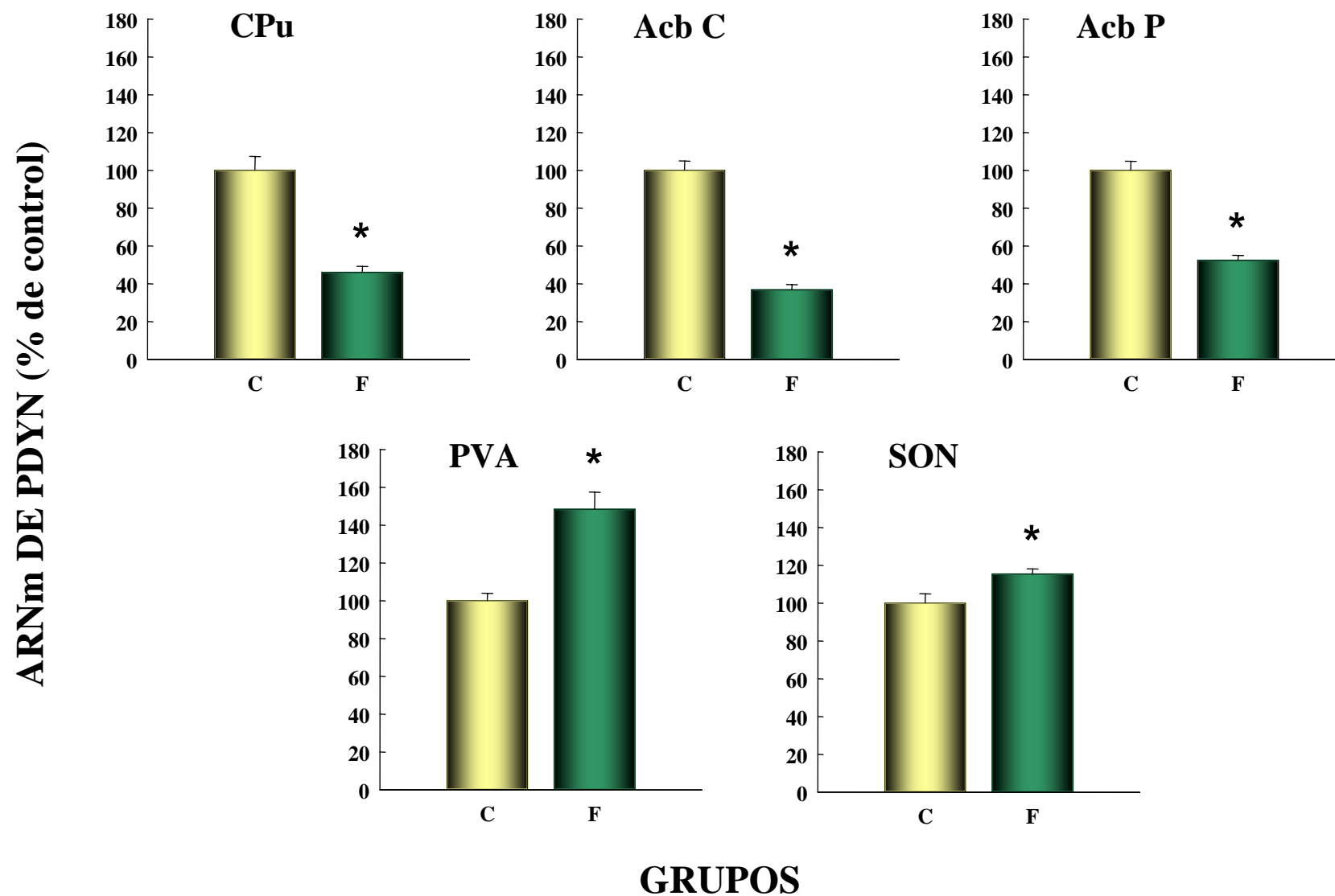
**Figura R-10.** Efecto del tratamiento crónico de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; F, grupo forzado; PENK, proencefalina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.



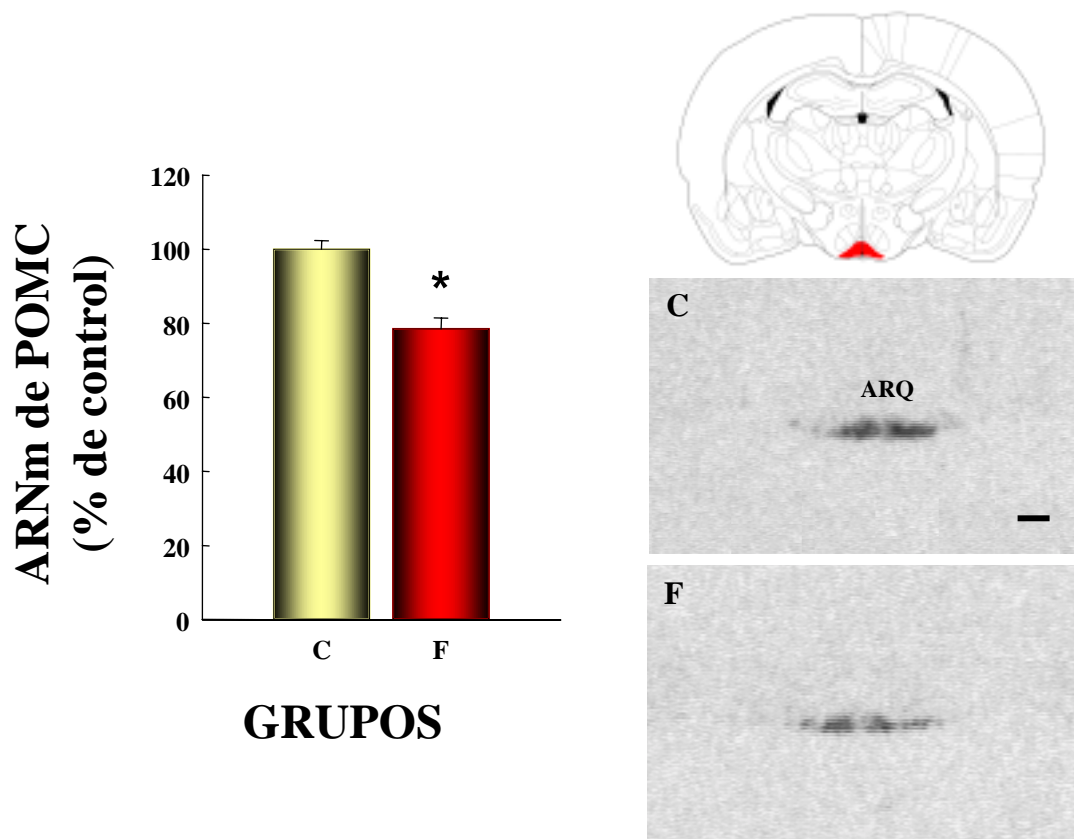
**Figura R-11.** Efecto del tratamiento crónico de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo paraventricular y ventricular del hipotálamo y la amígdala central. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; F, grupo forzado; PENK, proencefalina; Ce, amígdala central; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo.



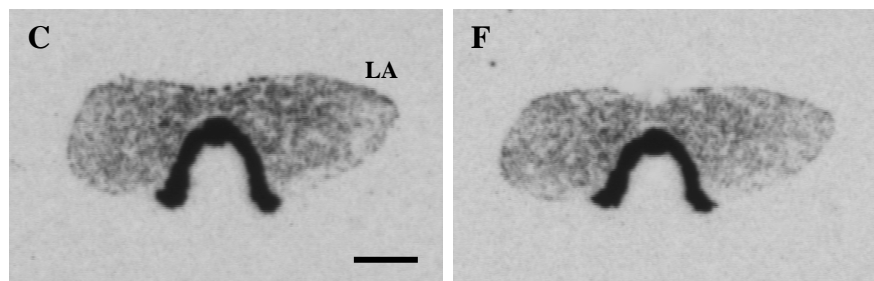
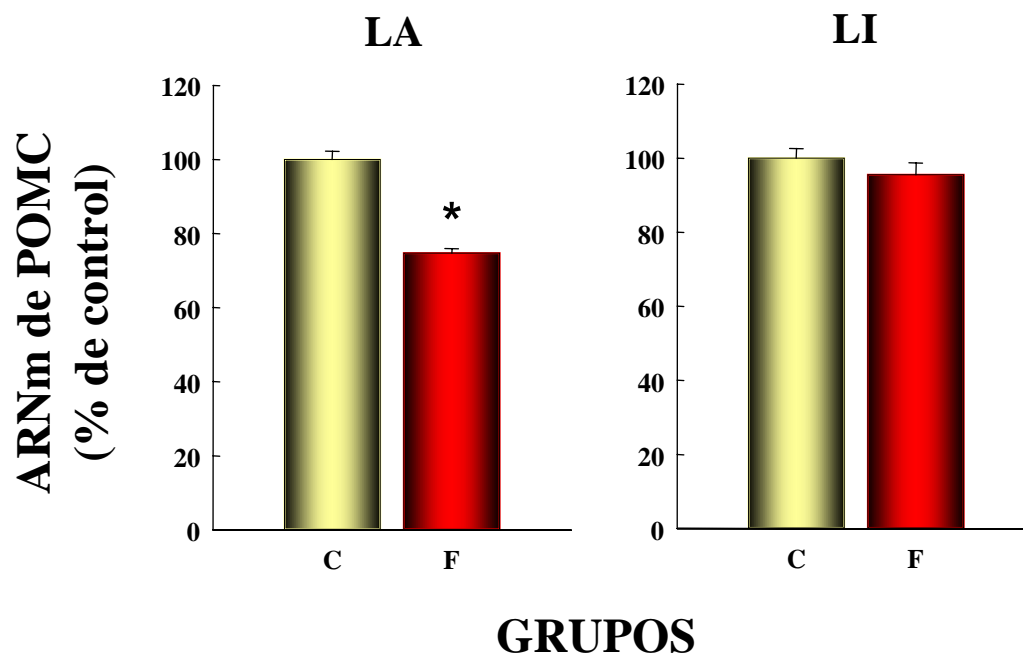
**Figura R-12.** Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de proencefalina a nivel de los núcleos ventromedial del hipotálamo, paraventricular del hipotálamo y caudado-putamen de los grupos control y consumo forzado de etanol. Barra = 1 mm. C, grupo control; F, grupo forzado; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo.



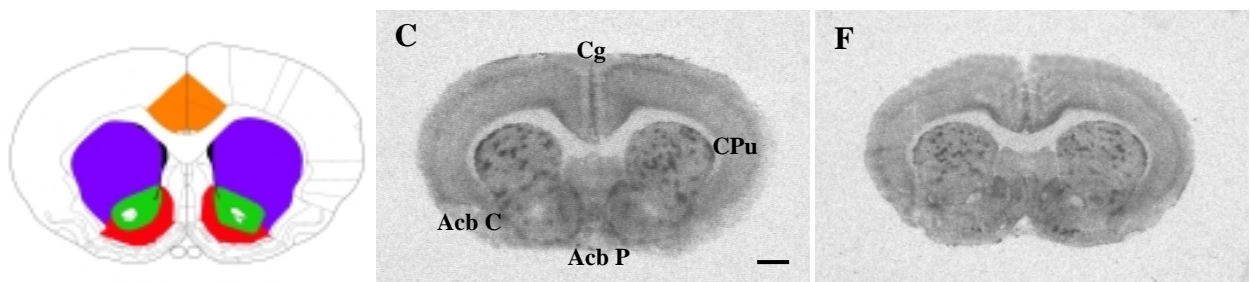
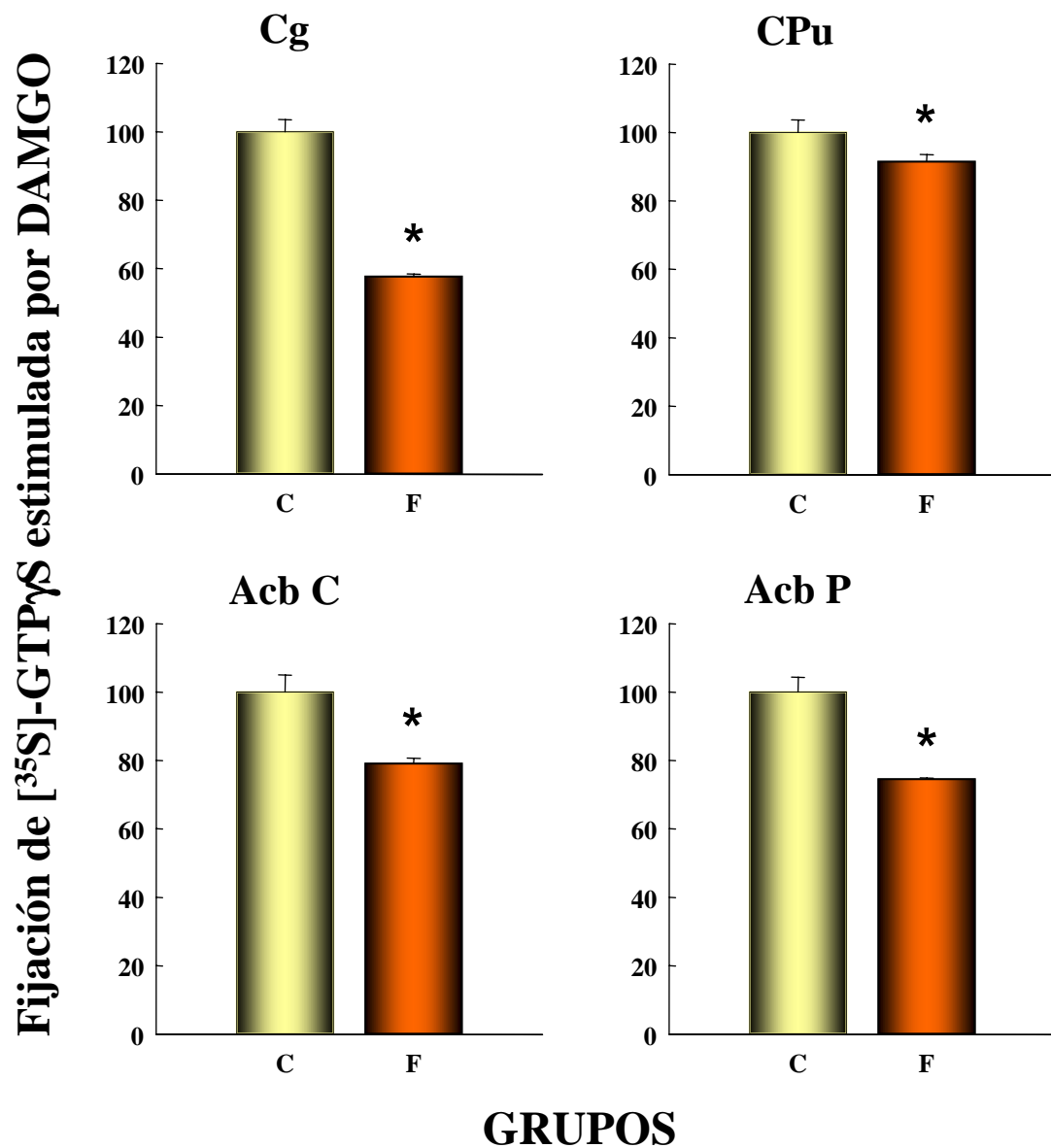
**Figura R-13.** Efecto del tratamiento crónico de etanol forzado sobre la expresión génica de prodinorfina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, núcleo paraventricular del hipotálamo y núcleo supraóptico. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de prodinorfina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; F, grupo forzado; PDYN, prodinorfina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; SON, núcleo supraóptico.



**Figura R-14.** Efecto del tratamiento crónico de etanol forzado sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1 mm. C, grupo control; F, grupo forzado; POMC, proopiomelanocortina; ARQ, núcleo arqueado.



**Figura R-15.** Efecto del tratamiento crónico de etanol forzado sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1mm. C, grupo control; F, grupo forzado; POMC, proopiomelanocortina; LA, lóbulo anterior de la hipófisis; LI, lóbulo intermedio de la hipófisis.



**Figura R-16.** Efecto del consumo crónico forzado de etanol sobre la fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO y autorradiogramas representativos. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; F, grupo forzado. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico.



### **3. Efectos del consumo crónico y voluntario de etanol sobre la actividad del sistema opioide endógeno y dopaminérgico en ratas Wistar. Diferencias en la expresión génica de los péptidos opioides y la tirosina hidroxilasa y alteraciones en la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide.**

#### ***3.1. Patrón de consumo.***

En la Figura R-17 se presenta la evolución de la conducta a lo largo de todo el experimento de ingesta voluntaria de etanol. Los datos de la conducta de ingestión resultantes fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Student Newman-Keul. Los factores analizados fueron los grupos de animales según consumo de etanol (preferentes o no preferentes), el tiempo y la interacción entre ambos. Se observa en la figura una primera fase de inducción en la que podemos comprobar las diferencias de consumo de etanol entre animales preferentes y no preferentes en lo referente a la adquisición de la conducta de consumo de etanol. Mientras que los animales preferentes consumen etanol a una media de 5 g/kg/día los animales no preferentes lo hacen a 2 g/kg/día. Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre los grupos preferente y no preferente [ $F(1,194)=193,44$ ;  $P<0,001$ ] en cada uno de los días analizados [ $F(12,194)=193,44$ ;  $P<0,001$ ] exceptuando el día 2. No se encontraron diferencias significativas en la interacción de los grupos y el tiempo [ $F(12,194)=1,749$ ;  $P=0.061$ ]. Por lo que respecta a la fase de mantenimiento, podemos observar que se mantienen las diferencias de consumo entre los grupos preferente y no preferente [ $F(1,194)=139,61$ ;  $P<0,001$ ] en cada día de esta fase [ $F(12,194)=2,005$ ;  $P=0,027$ ] y sin encontrar diferencias en la interacción entre los grupos y el tiempo [ $F(1,194)=1,225$ ;  $P<0.270$ ]. A lo largo del mantenimiento de la conducta de ingestión de etanol los animales preferentes consumieron una media de 4 g/kg/día mientras que los animales no preferentes lo hicieron a una media de 2 g/kg/día. El mantenimiento del consumo de etanol durante la fase de mantenimiento demuestra que el

etanol por sí mismo se comporta como reforzador positivo favoreciendo así la ingesta de etanol.

### ***3.2. Efecto sobre la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa de conducta preferente para el consumo de etanol en ratas Wistar.***

La ingesta crónica voluntaria de etanol disminuyó los niveles de ARNm de tirosina hidroxilasa significativamente en los grupos preferente y no preferente frente al grupo control en el área ventral tegmental y solo del grupo preferente respecto al control como en la sustancia nigra (Figura R-18). Así, se encontró una disminución del **42%** en el **grupo preferente** [ $F(2,20)=16,00$ ;  $P<0,001$ ] y del **22%** en el **grupo no preferente** [ $F(2,20)=9,27$ ;  $P<0,001$ ] frente al control y una disminución del **20%** del **grupo preferente** frente al **grupo no preferente** [ $F(2,20)=7,56$ ;  $P<0,001$ ] en el área ventral tegmental. En la sustancia nigra, también se halló una disminución estadísticamente significativa en el grupo preferente respecto al control de **24%** [ $F(2,20)=4,28$ ;  $P=0,018$ ]. No se hallaron diferencias entre el control y el grupo no preferente o entre los grupos preferente y no preferente. En la misma figura también se presentan autorradiogramas representativos del efecto que tiene el consumo crónico voluntario de etanol sobre las densidades ópticas encontradas en ambos núcleos.

En nuestro experimento de consumo crónico voluntario de etanol se ha comprobado como la expresión génica de proencefalina varía según el tipo de consumo de los animales y la región analizada (Figuras R-19, R-20 y R-21). Así, se observa como se obtuvieron disminuciones de los niveles de ARNm de proencefalina tanto en animales preferentes como en animales no preferentes en el núcleo caudado-putamen (**preferente vs control, 32%**;  $F(2,19)=8,59$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 22%**;  $F(2,19)=5,81$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens periférico (**preferente vs control, 26%**;  $F(2,19)=5,58$ ;  $P=0,003$ ; **no preferente vs control, 16%**;  $F(2,19)=3,36$ ;  $P=0,029$ ), la amígdala central (**preferente vs control, 14%**;  $F(2,20)=7,12$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 15%**;  $F(2,20)=7,80$ ;  $P<0,001$ ) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (**preferente vs control, 14%**;

$F(2,22)=7,69$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 10%**;  $F(2,22)=5,06$ ;  $P=0,002$ ). En ninguno de estos núcleos analizados con anterioridad se encontraron diferencias entre los grupos preferente y no preferente. Por otro lado, el consumo crónico voluntario también disminuyó el nivel de ARNm de proencefalina en el grupo preferente frente al control y al grupo no preferente en el núcleo accumbens central (**preferente vs control, 40%**;  $F(2,20)=7,52$ ;  $P<0,001$ ; **preferente vs no preferente, 27%**;  $F(2,20)=5,32$ ;  $P=0,002$ ), el tubérculo olfatorio (**preferente vs control, 17%**;  $F(2,20)=4,51$ ;  $P=0,005$ ; **preferente vs no preferente, 18%**;  $F(2,20)=5,30$ ;  $P=0,006$ ) y la corteza piriforme (**preferente vs control, 20%**;  $F(2,18)=3,11$ ;  $P=0,043$ ; **preferente vs no preferente, 24%**;  $F(2,18)=3,81$ ;  $P=0,040$ ). Por último, es interesante señalar que en el núcleo paraventricular del hipotálamo el consumo crónico voluntario de etanol produjo un aumento de los niveles de ARNm de proencefalina tanto en animales preferentes como en no preferentes (**preferente vs control, 20%**;  $F(2,16)=5,49$ ;  $P=0,002$ ; **no preferente vs control, 23%**;  $F(2,16)=6,17$ ;  $P=0,002$ ) sin encontrar diferencias entre los niveles de los grupos preferente y no preferente.

Como muestra la figura R-22, la ingesta crónica voluntaria de etanol produjo una disminución importante en el nivel de ARNm de prodinorfina en los animales preferentes y no preferentes con respecto al control, siendo esta disminución mayor y estadísticamente significativa en los animales preferentes frente a los animales no preferentes en el núcleo accumbens central (**preferente vs control, 60%**;  $F(2,20)=14,79$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 24%**;  $F(2,20)=5,71$ ;  $P=0,002$ ; **preferente vs no preferente, 37%**;  $F(2,20)=9,08$ ;  $P=0,002$ ) y el núcleo accumbens periférico (**preferente vs control, 60%**;  $F(2,20)=9,56$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 24%**;  $F(2,20)=6,42$ ;  $P=0,002$ ; **preferente vs no preferente, 11%**;  $F(2,20)=3,13$ ;  $P=0,040$ ). También se observó una disminución de la expresión génica de prodinorfina en los animales preferentes solamente en el núcleo caudado-putamen (**preferente vs control, 32%**;  $F(2,20)=4,92$ ;  $P=0,007$ ) y un aumento de la expresión génica de prodinorfina tras el consumo crónico voluntario de etanol en ambos grupos de consumo de etanol frente al control en el núcleo paraventricular (**preferente vs control, 34%**;  $F(2,20)=4,67$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs**

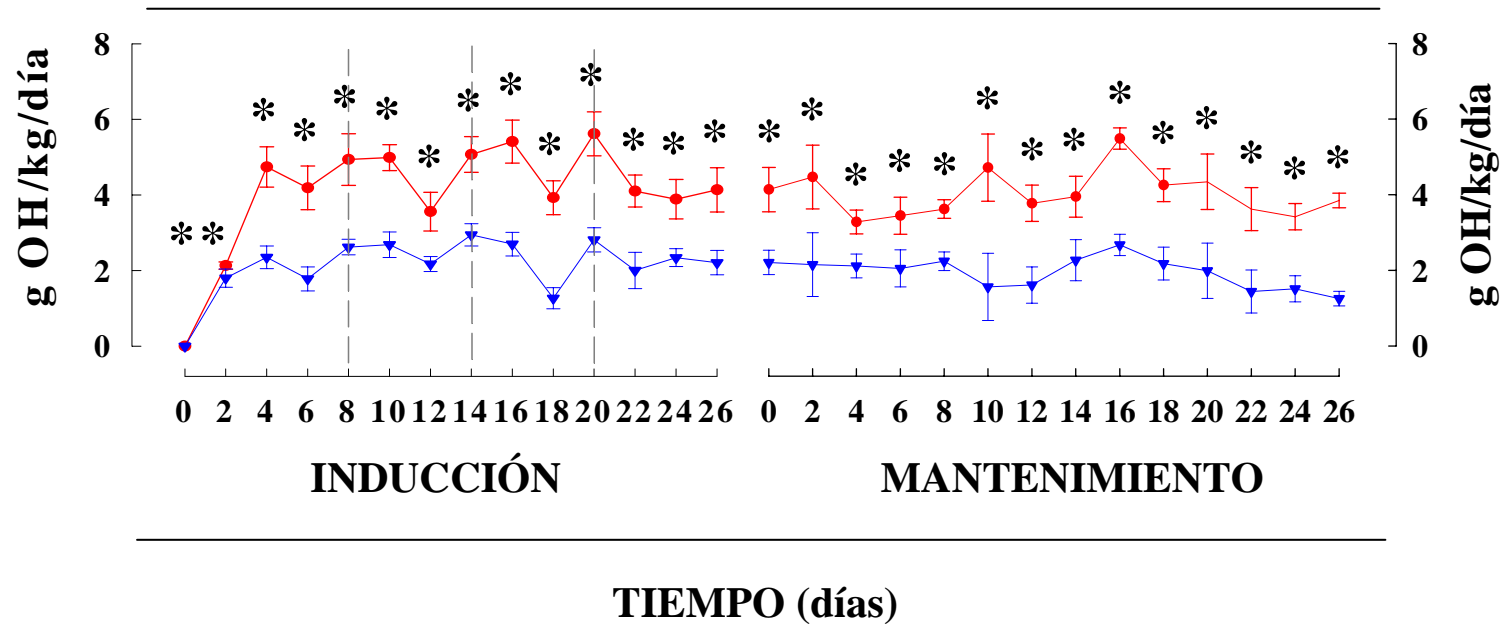
**control, 26%**;  $F(2,20)=3,61$ ;  $P=0,020$ ) y en el núcleo supraóptico (**preferente vs control, 33%**;  $F(2,20)=4,10$ ;  $P=0,025$ ; **no preferente vs control, 26%**;  $F(2,20)=3,78$ ;  $P=0,016$ ).

Por lo que respecta a la proopiomelanocortina (Figura R-23), en el núcleo arqueado se produce una disminución de la expresión del mensajero tras el consumo crónico voluntario de etanol en el grupo preferente respecto al control y al grupo no preferente (**preferente vs control, 21%**;  $F(2,17)=6,16$ ;  $P=0,002$ ; **preferente vs no preferente, 11%**;  $F(2,17)=3,07$ ;  $P=0,046$ ). En el lóbulo anterior de la hipófisis (Figura R-24), se obtuvo una disminución de los niveles de ARNm de prodinorfina tanto en el grupo preferente como en el grupo no preferente con respecto al control (**preferente vs control, 13%**;  $F(2,20)=4,96$ ;  $P=0,003$ ; **no preferente vs control, 20%**;  $F(2,20)=8,47$ ;  $P<0,001$ ) sin que existan diferencias entre los grupos preferente y no preferente entre sí. Por otro lado, las diferencias halladas en el lóbulo intermedio de la hipófisis fueron una disminución de los niveles de ARNm de proopiomelanocortina en el grupo no preferente con respecto al control (**no preferente vs control, 20%**;  $F(2,20)=8,47$ ;  $P<0,001$ ). En este último caso, no se produjeron diferencias entre el grupo preferente y el control o entre los grupos preferente y no preferente. Los resultados obtenidos sobre la expresión génica de proopiomelanocortina quedan claramente reflejados por las diferencias en la señal de hibridación entre el grupo no preferente y el resto de grupos en los autorradiogramas en las Figuras R-23 y R-24.

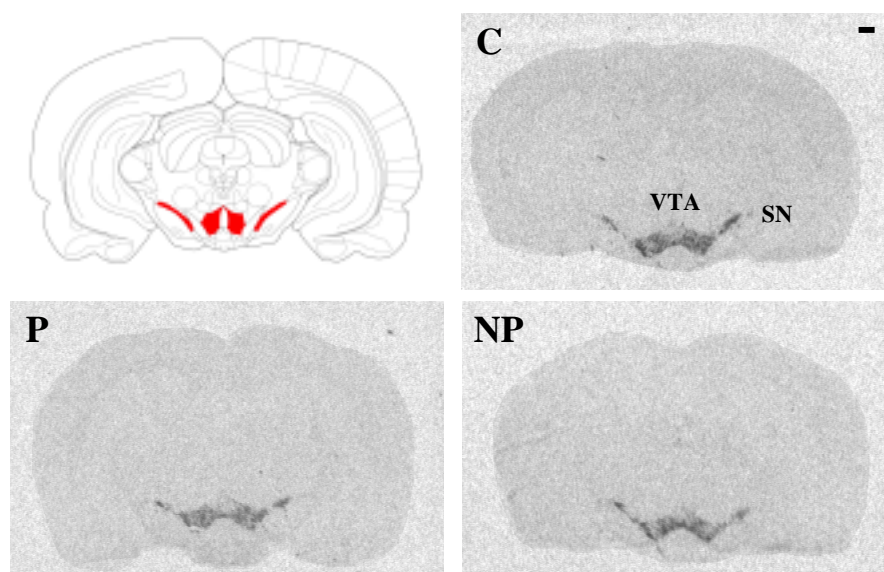
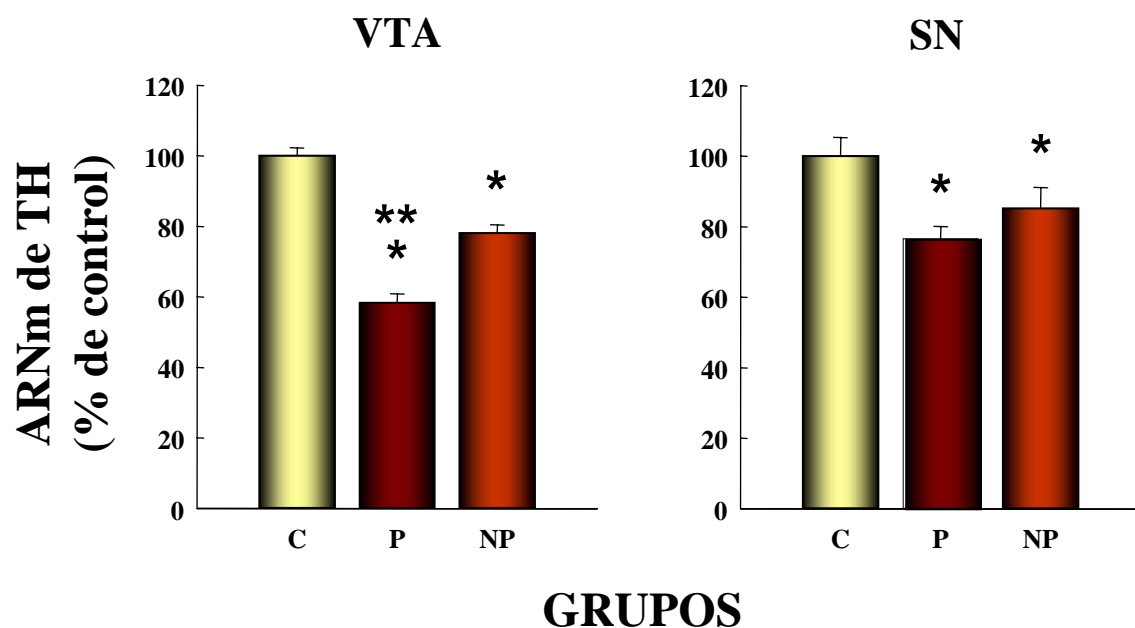
### ***3.3. Efecto del patrón de consumo de etanol sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide.***

Como muestra la Figura R-25, al consumo crónico voluntario de etanol disminuyó significativamente la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO tanto en el grupo preferente como no preferente respecto al control en la corteza cingulada (**preferente vs control, 54%**;  $F(2,20)=20,32$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 34%**;  $F(2,20)=12,43$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo caudado-putamen (**preferente vs control, 26%**;  $F(2,20)=13,49$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 34%**;  $F(2,20)=12,43$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens

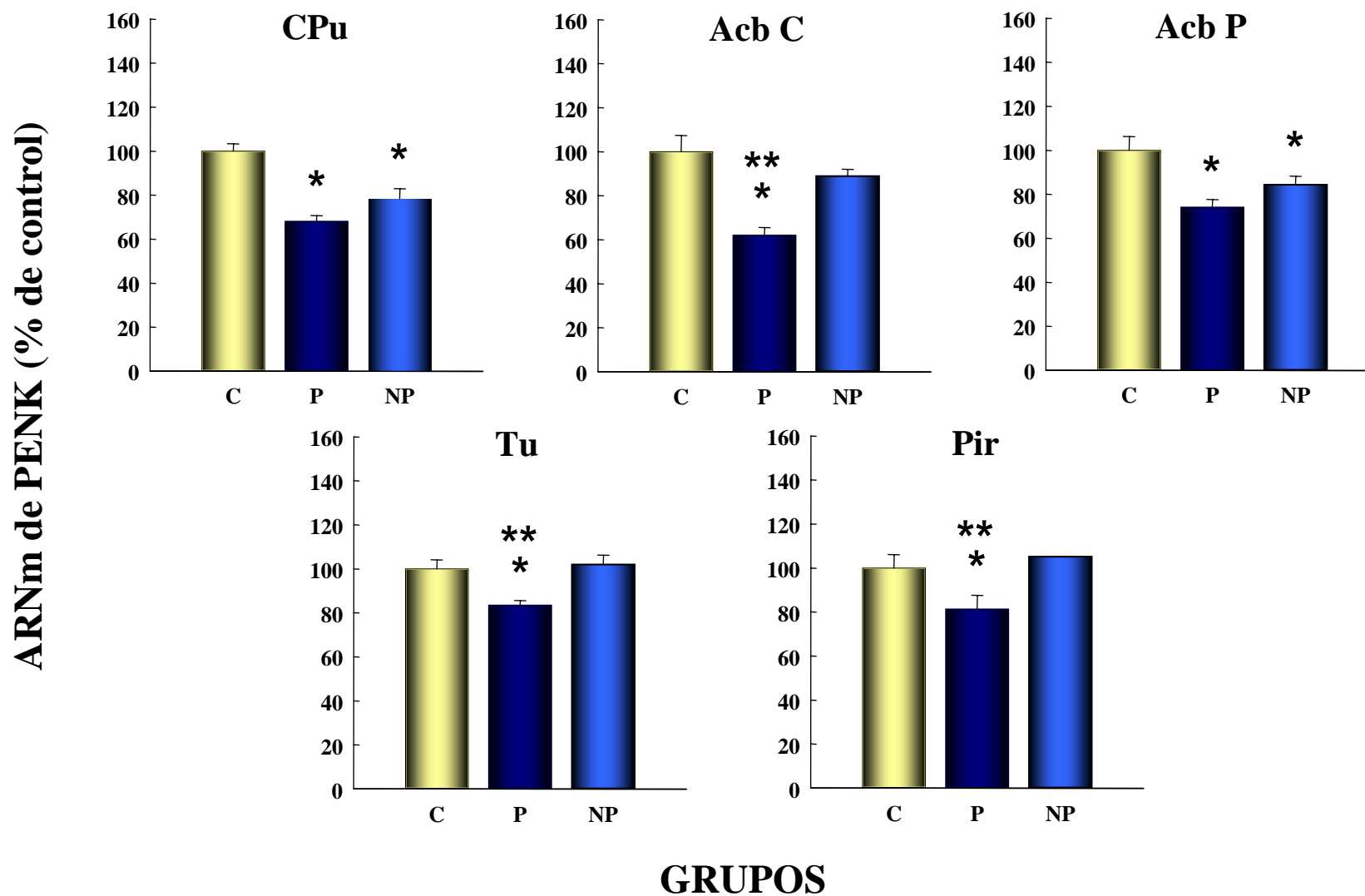
central (**preferente vs control, 34%**;  $F(2,20)=8,23$ ;  $P<0,001$ ; **no preferente vs control, 24%**;  $F(2,20)=5,46$ ;  $P=0,001$ ) y el núcleo accumbens periférico (**preferente vs control, 58%**,  $[F(2,20)=21,36$ ;  $P<0,001]$ ; **no preferente vs control, 36%**  $F(2,20)=13,43$ ;  $P<0,001$ ). Además, también se encontraron diferencias entre los grupos preferente y no preferente en la corteza cingulada (**preferente vs no preferente, 20%**;  $F(2,20)=7,84$ ;  $P<0,001$ ), en el núcleo caudado-putamen (**preferente vs no preferente, 8%**;  $F(2,20)=3,18$ ;  $P=0,037$ ) y el núcleo accumbens periférico (**preferente vs no preferente, 22%**;  $F(2,20)=7,84$ ;  $P<0,001$ ) en la fijación de [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO. En la Figura R-26 se exponen los autorradiogramas representativos de la funcionalidad de los receptores  $\mu$  opioides en relación al consumo crónico y voluntario de etanol.



**Figura R-17.** Patrón de consumo de de animales preferentes frente a animales no preferentes. Los puntos representan las medias  $\pm$  1 error estándar del consumo de la droga. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo preferente frente al no preferente. Grupo preferente, —●— ; Grupo no preferente, —▼—

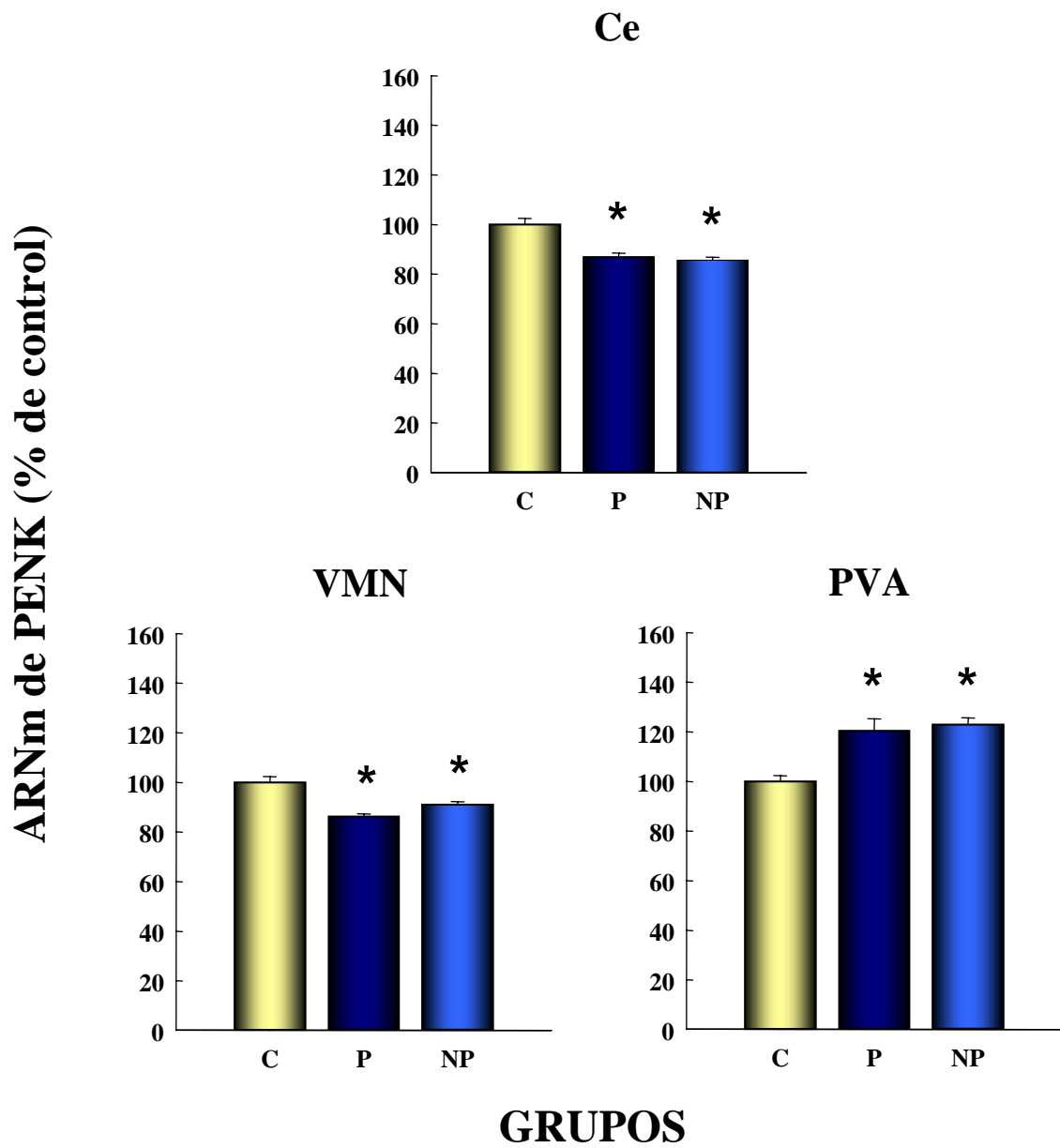


**Figura R-18.** Efecto del consumo crónico voluntario de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de tirosina hidroxilasa tras el consumo de etanol. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo preferente respecto al grupo no preferente. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; TH, tirosina hidroxilasa

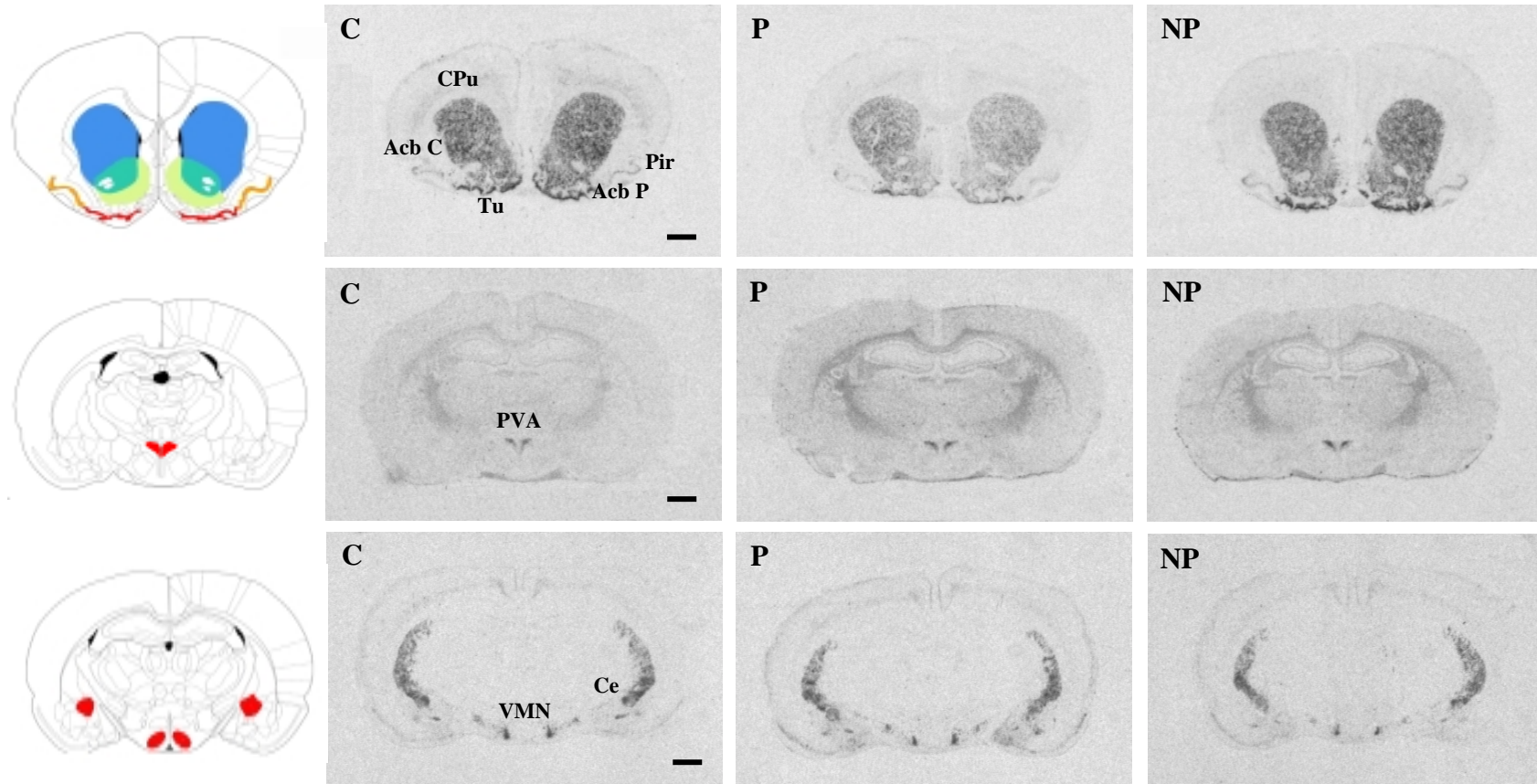


**Figura R-19.** Efecto del consumo crónico voluntario de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens core, núcleo accumbens shell, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo preferente respecto al grupo no preferente. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; PENK, proencefalina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb Sh, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.

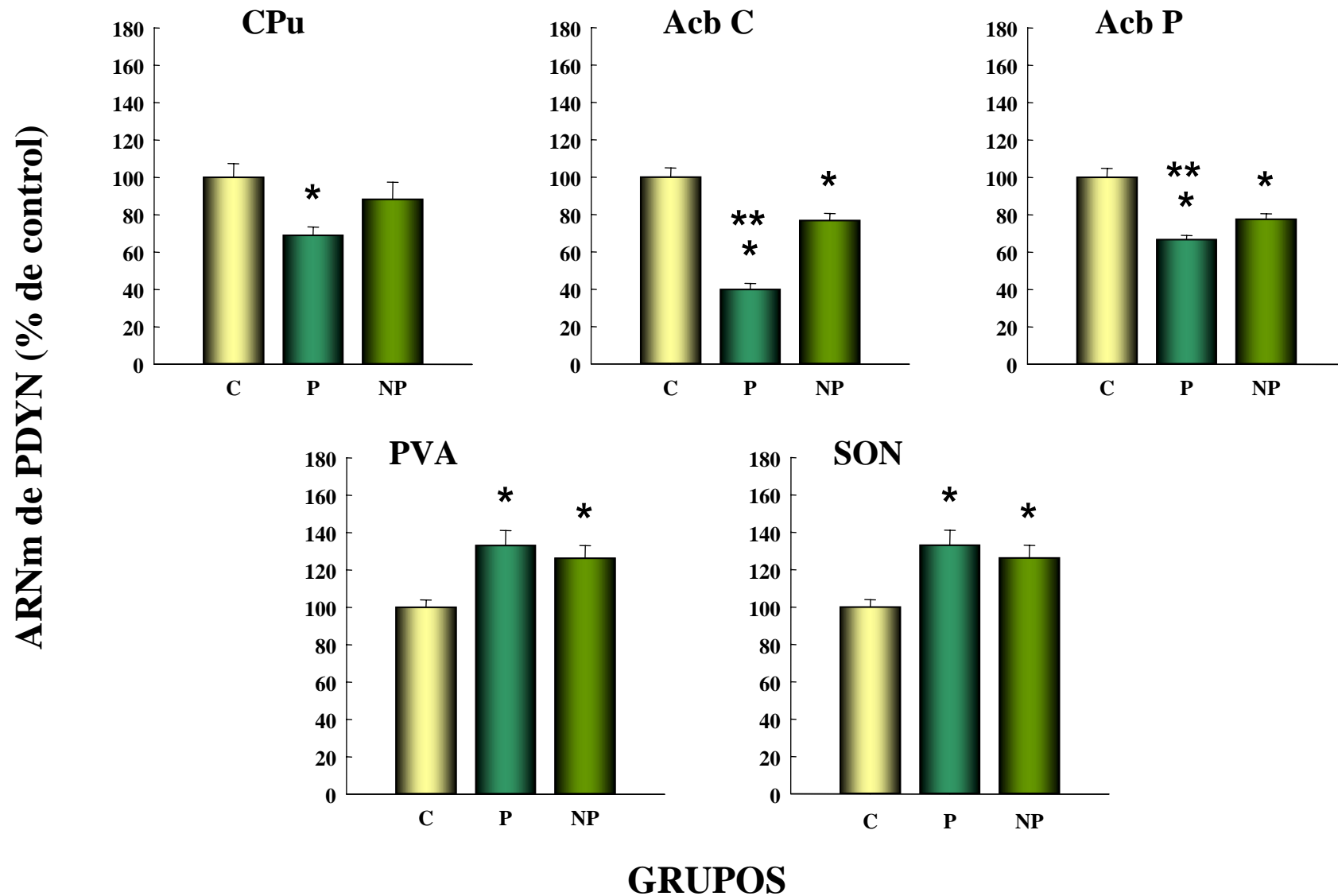




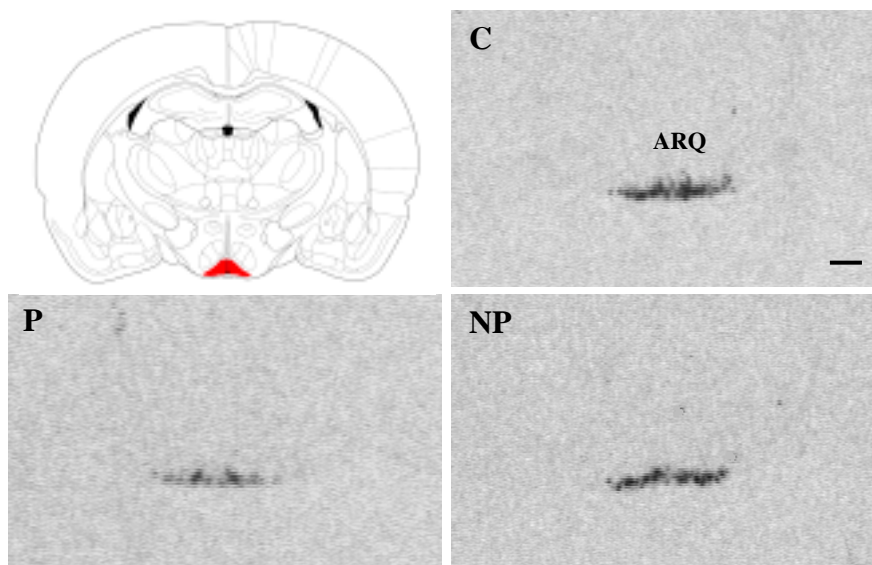
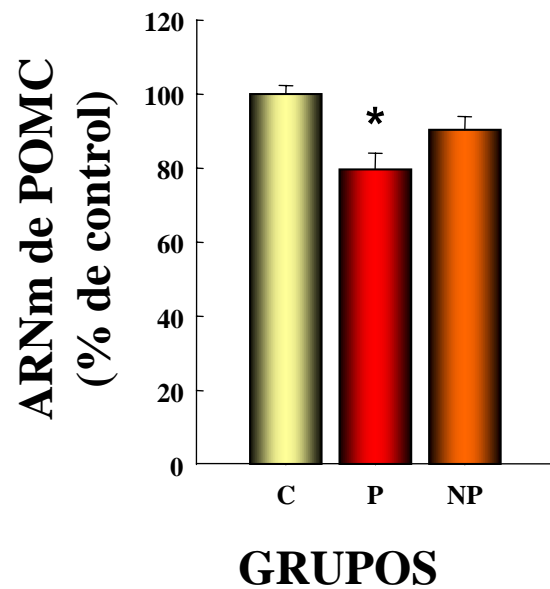
**Figura R-20.** Efecto de la ingestión crónica voluntaria de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo ventromedial del hipotálamo y la amígdala central. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; PENK, proencefalina; Ce, amígdala central; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo.



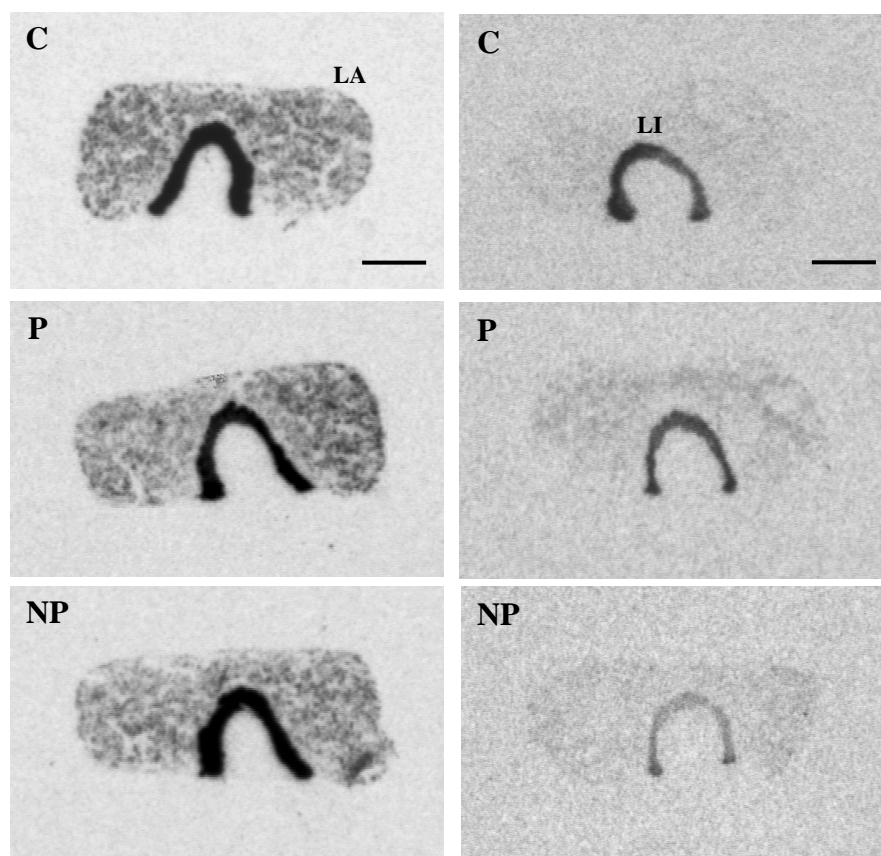
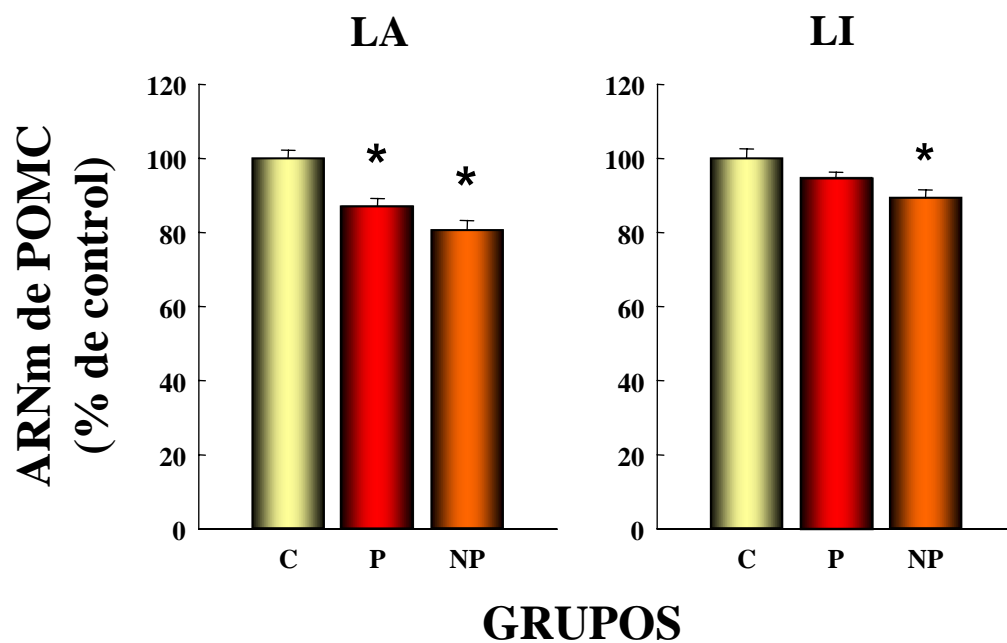
**Figura R-21.** Autorradiogramas de secciones coronales representativos del efecto de la ingestión crónica voluntaria de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, accumbens central y periférico, paraventricular y ventromedial del hipotálamo, tubérculo olfatorio, corteza piriforme y la amígdala central. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; PENK, proencefalina; Ce, amígdala central; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.



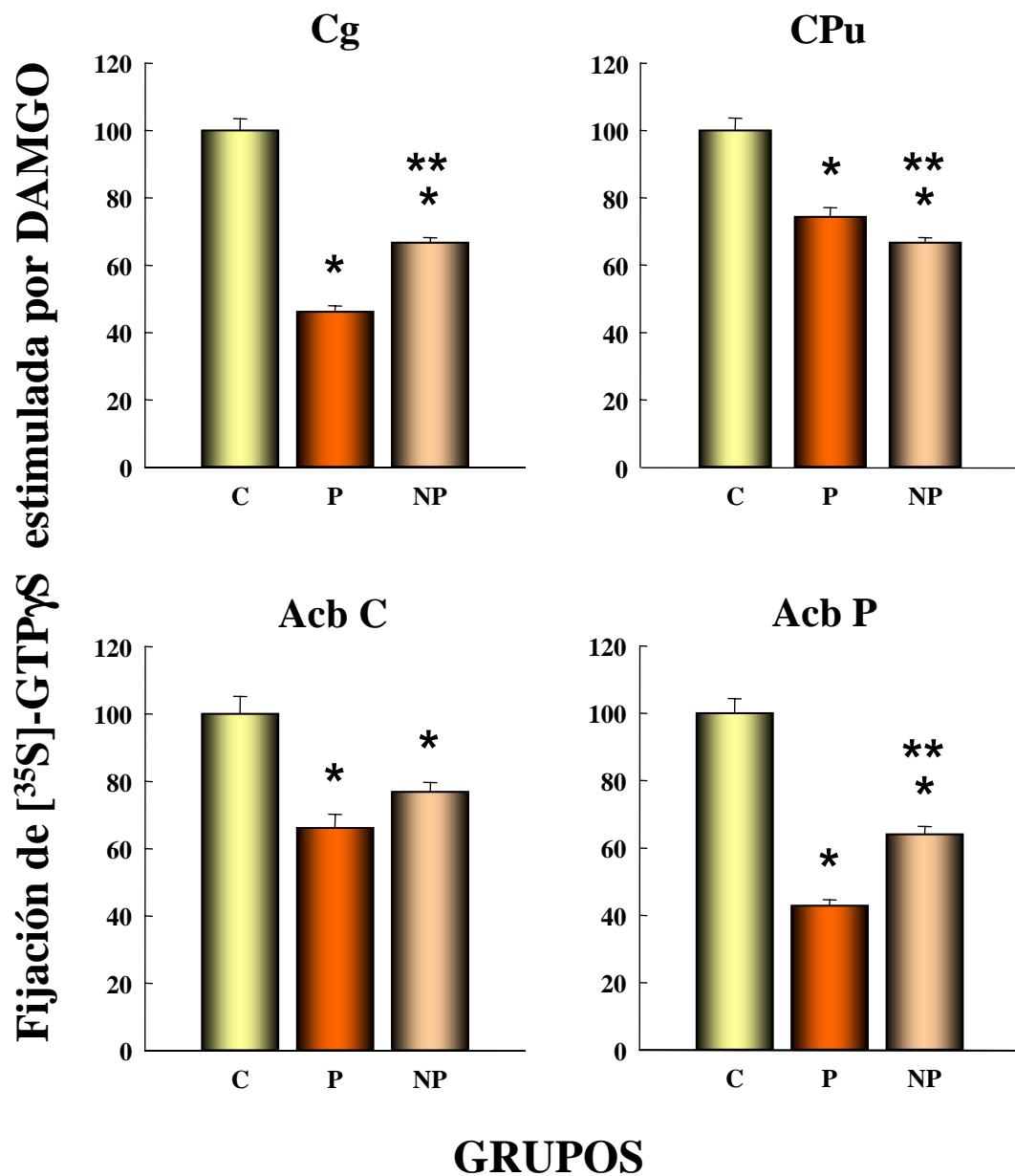
**Figura R-22.** Efecto de la ingesta crónica voluntaria de etanol la expresión génica de prodinorfina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, núcleo paraventricular del hipotálamo y núcleo supraóptico. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de prodinorfina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo preferente respecto al grupo no preferente. C, grupo control; F, grupo forzado; PDYN, prodinorfina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; SON, núcleo supraóptico.



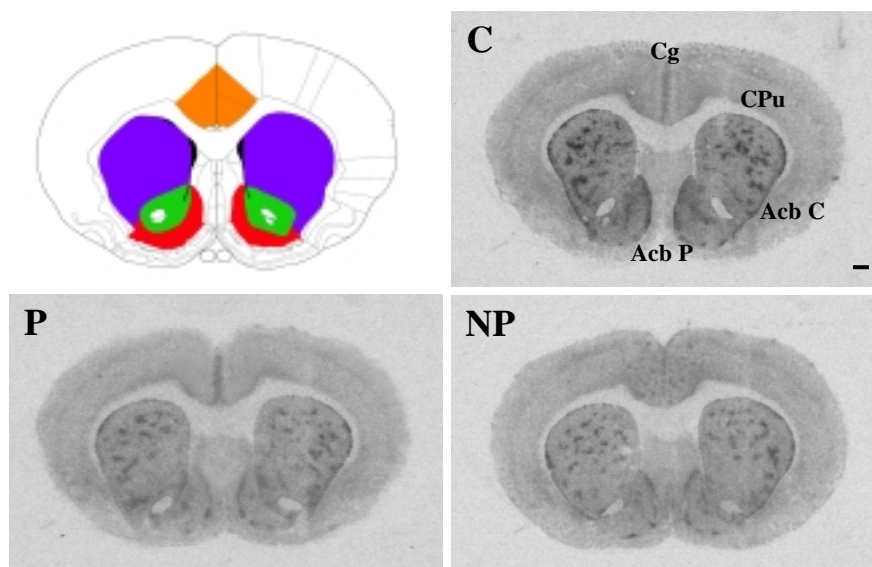
**Figura R-23.** Efecto de la ingesta crónica voluntaria de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1 mm. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; POMC, proopiomelanocortina; ARQ, núcleo arqueado.



**Figura R-24.** Efecto de la ingesta crónica voluntaria de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1 mm. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente; POMC, proopiomelanocortina; LA, lóbulo anterior de la hipófisis; LI, lóbulo intermedio de la hipófisis.



**Figura R-25.** Efecto de la ingesta crónica voluntaria de etanol sobre la fijación de  $[^{35}\text{S}]$ -GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la fijación de  $[^{35}\text{S}]$ -GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y el símbolo \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo P. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Cg, corteza cingulada.



**Figura R-26.** Autorradiogramas representativos del efecto de la ingesta crónica voluntaria de etanol sobre la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$  estimulada por DAMGO. Barra = 1 mm. C, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Cg, corteza cingulada.



#### **4. Marcadores neuroquímicos implicados en la vulnerabilidad por el consumo de etanol. Estudio comparativo entre ratas Wistar y Fawn-Hooded.**

##### ***4.1. Diferencias conductuales en la preferencia de consumo de etanol entre ratas Wistar y Fawn-Hooded.***

En la Figura R-27 se puede ver las diferencias en la evolución de la conducta de ingesta de etanol entre ambas razas empleadas. Los datos de la conducta de ingestión resultantes fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Student Newman-Keul. Los factores analizados fueron las raza de los animales (Wistar o Fawn-Hooded), el tiempo y la interacción entre ambos. Se observa en la figura una primera fase de inducción en la que ya se puede comprobar la existencia de claras diferencias de conducta en presencia de etanol por parte de ambas razas. Mientras que los animales Fawn-Hooded consumen etanol a una media de 5 g/kg/día los animales Wistar lo hacen a 2 g/kg/día. Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre animales Fawn-Hooded y Wistar [ $F(1,192)=192,44$ ;  $P<0,001$ ] en cada uno de los días analizados [ $F(12,192)=190,44$ ;  $P<0,001$ ] exceptuando los primeros 6 días. No se encontraron diferencias significativas en la interacción de los grupos y el tiempo [ $F(12,192)=1,849$ ;  $P=0,071$ ]. Por lo que respecta a la fase de mantenimiento, podemos observar que se mantienen las diferencias de consumo entre los animales Fawn-Hooded y Wistar [ $F(1,192)=137,61$ ;  $P<0,001$ ] en cada día de esta fase [ $F(12,192)=1,985$ ;  $P=0,019$ ] y sin encontrar diferencias en la interacción entre los grupos y el tiempo [ $F(1,192)=1,555$ ;  $P<0,280$ ]. A lo largo del mantenimiento de la conducta de ingestión de etanol los animales Fawn-Hooded consumieron una media de 5 g/kg/día mientras que los animales Wistar lo hicieron a una media de 2 g/kg/día. El mantenimiento del consumo de etanol durante la fase de mantenimiento demuestra que el etanol por sí mismo se comporta como reforzador positivo favoreciendo así la ingesta de etanol en ambos grupos de animales.



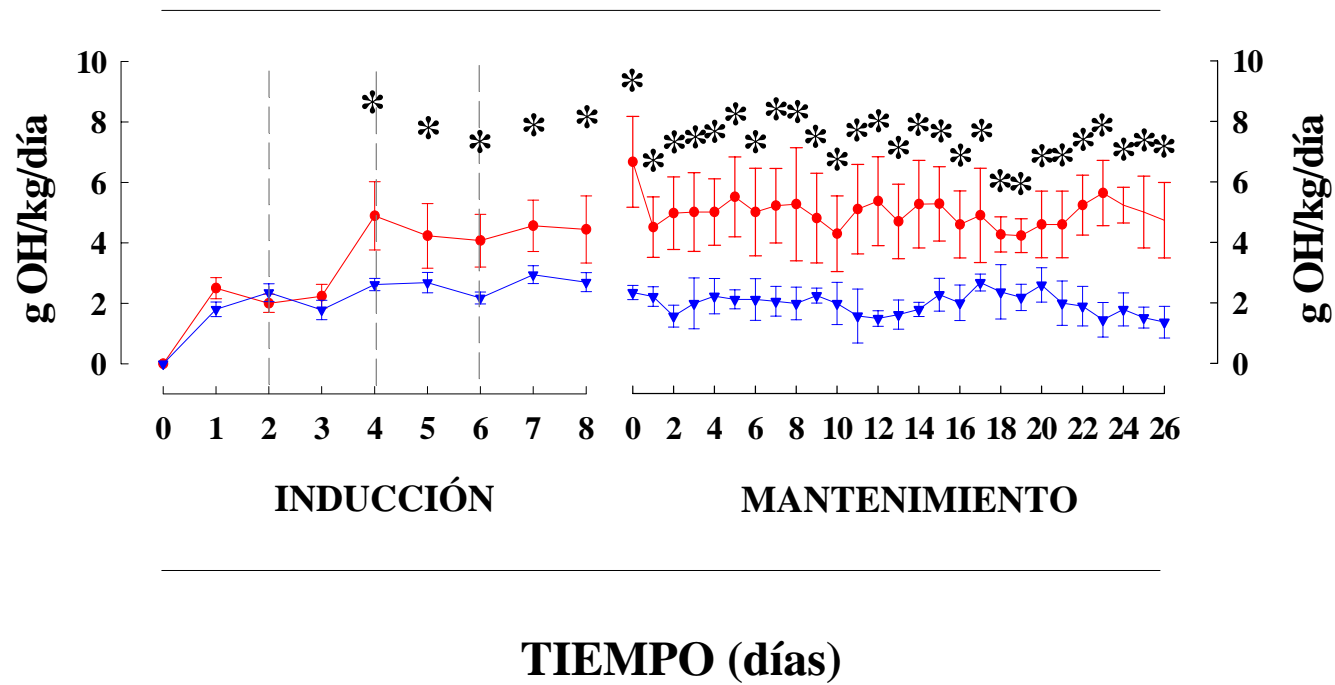
#### ***4.2. Diferencias basales en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa entre ratas Wistar y Fawn-Hooded.***

El análisis de la expresión génica de tirosina hidroxilasa entre animales Wistar y Fawn-Hooded no reveló diferencias basales en el área ventral tegmental ( $t=-0,639$ ;  $P=0,535$ ) y sustancia nigra ( $t=0,154$ ;  $P=0,880$ ) entre razas (Figura R-28).

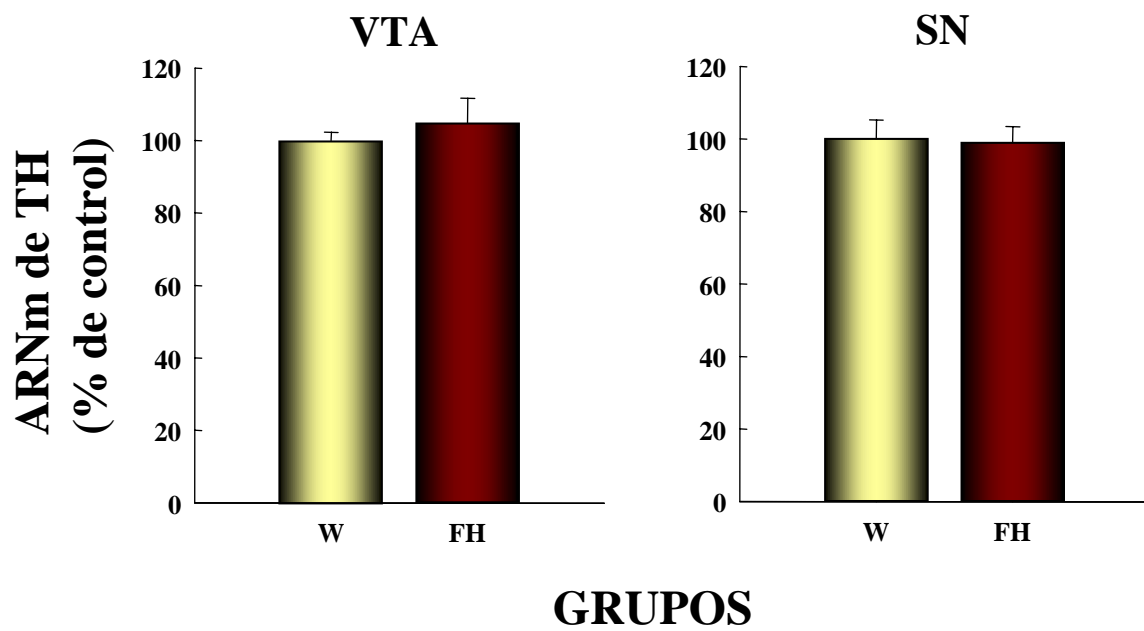
Por lo que respecta a la proopiomelanocortina, en la figura R-29 podemos observar como en el núcleo arqueado de los animales Fawn-Hooded existe una disminución basal de la expresión del mensajero de un **22%** ( $t=6,619$ ;  $P<0,001$ ).

#### ***4.3. Diferencias basales en la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide entre las ratas Wistar y Fawn-Hooded.***

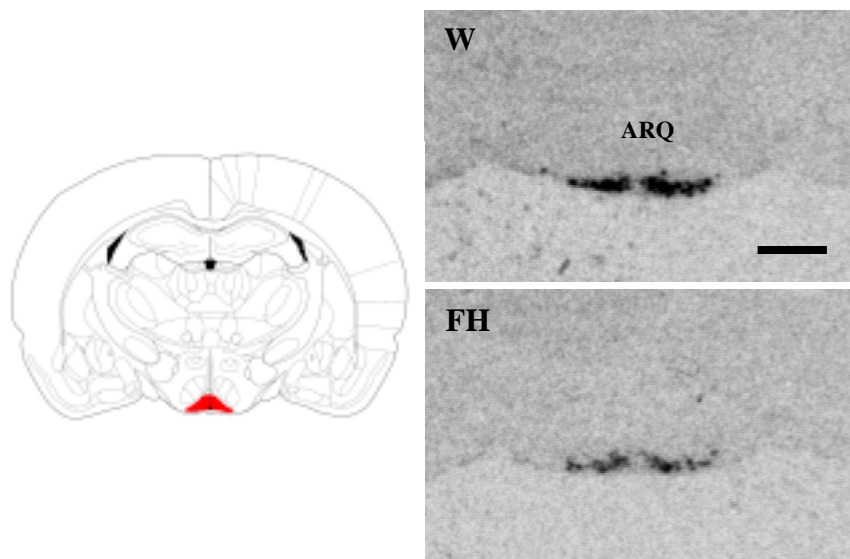
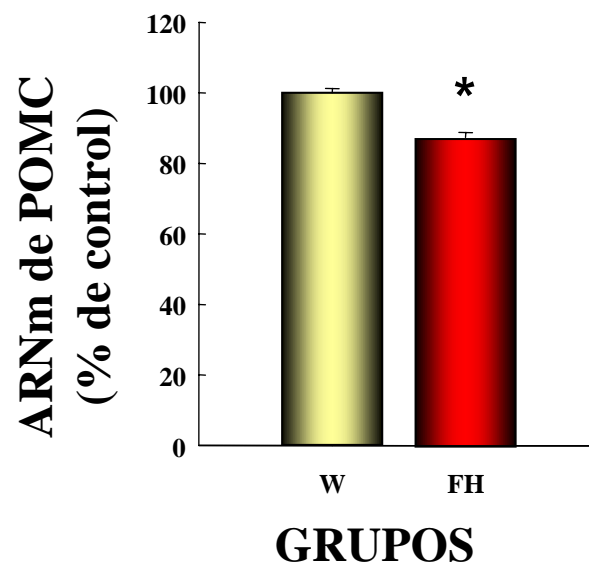
Como muestra la Figura R-30, existen diferencias basales en la funcionalidad basal del receptor  $\mu$  opioide medida por la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO. Se hallaron disminuciones de la funcionalidad basal en el núcleo caudado-putamen ( $t=11,583$ ;  $P<0,001$ ), corteza cingulada ( $t=9,568$ ;  $P<0,001$ ) y núcleo accumbens ( $t=10,152$ ;  $P<0,001$ ) en la corteza cingulada, en un **21%** ( $t=5,827$ ;  $P<0,001$ ). En la misma figura se presentan gráficamente las diferencias encontradas entre ambas razas en las distintas regiones analizadas.



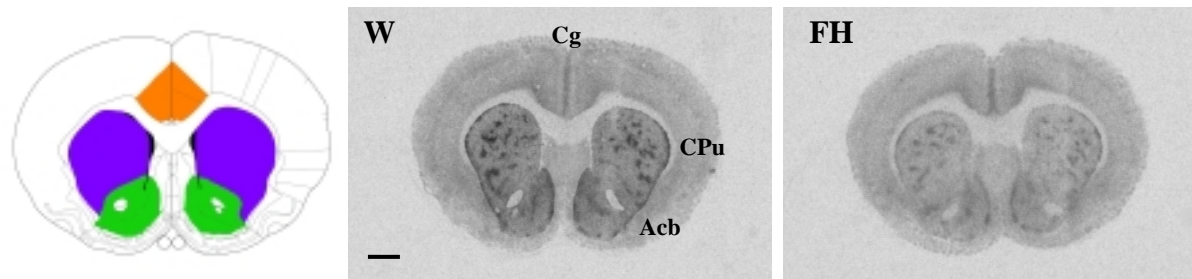
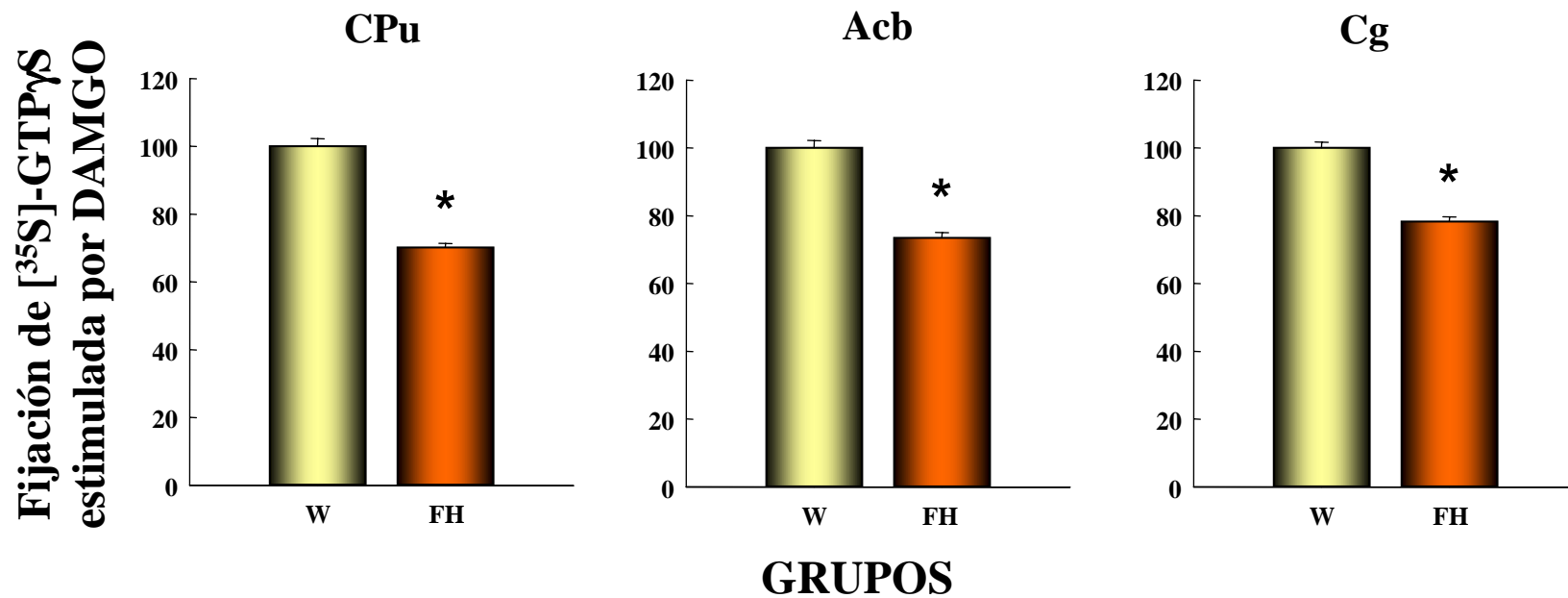
**Figura R-27.** Patrón de consumo de etanol crónico voluntario comparativo entre las razas Wistar y Fawn-Hooded. Los puntos representan las medias  $\pm$  1 error estándar del consumo de la droga. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo Fawn-Hooded frente al Wistar. Grupo preferente, ● ; Grupo no preferente, ▼



**Figura R-28.** Diferencias basales en la expresión génica de proopiomelanocortina entre las razas Wistar y Fawn-Hooded en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. C, grupo control; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; TH, tirosina hidroxilasa.



**Figura R-29.** Diferencias basales en la expresión génica de proopiomelanocortina entre las razas Wistar y Fawn-Hooded en el núcleo arqueado. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de proopiomelanocortina. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. W, raza Wistar; FH, raza Fawn-Hooded; ARQ; núcleo arqueado; POMC, proopiomelanocortina.



**Figura R-30.** Efecto de la preferencialidad del consumo de etanol sobre la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Autorradiogramas representativos de la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control W, grupo control; P, grupo preferente; NP, grupo no preferente. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb, núcleo accumbens; Cg, corteza cingulada.

## **5. Estudio curso temporal de las alteraciones neuroadaptativas inducidas por la abstinencia voluntaria a etanol en ratas Fawn-Hooded.**

### ***5.1. Patrón de consumo.***

En la Figura R-31 podemos observar la evolución en la conducta de consumo de etanol durante las fases de inducción y de mantenimiento. La primera parte de la figura describe la conducta de los animales durante la fase de inducción. Como podemos ver esta fase está dividida en 4 partes que se corresponden con los incrementos sucesivos de etanol (de 0 a 10%) que permiten la adquisición de la conducta de autoadministración. Durante la fase con 2,5% de etanol los animales fueron incrementando la ingesta de etanol desde la ausencia de consumo hasta alcanzar los 5,5 g/kg/día de etanol. Este nivel alcanzado durante la primera etapa de la fase de inducción se mantuvo durante las fases de 5% y 7,5% de etanol como se puede comprobar en las gráficas. Sin embargo, al cambiar a la fase de 10% de etanol se produjo un incremento muy significativo en la ingesta de etanol llegando a alcanzarse los 9 g/kg/día en el punto intermedio de esta fase. Como se puede comprobar al final disminuyó la ingesta de etanol de nuevo hasta alcanzar los 7g/kg/día debido posiblemente a la aparición de efectos aversivos indeseables debidos a la dosis elevada de etanol.

En la fase de mantenimiento los niveles de ingesta de etanol se mantuvieron en todo momento constantes en torno a los 5 g/kg/día lo que corrobora que el etanol se comporta como reforzador positivo en este modelo experimental.

### ***5.2. Alteraciones en la expresión génica de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa durante la abstinencia de etanol.***

En la figura (Figura R-32) podemos comprobar el efecto de la retirada de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra y el área ventral tegmental. La retirada de la ingesta de etanol produce una respuesta diferente en relación

a la expresión génica de tirosina hidroxilasa en ambos núcleos analizados, esto es, una disminución significativa en los niveles de ARNm en el área ventral tegmental a **1 día (40%)** [ $F(5,40)=8,27$ ;  $P<0,001$ ], **3 días (38%)** [ $F(5,40)=8,27$ ;  $P<0,001$ ] y **7 días (15%)** [ $F(5,40)=8,27$ ;  $P<0,001$ ] y a **1 día (30%)** [ $F(5,40)=8,27$ ;  $P<0,001$ ] en la sustancia nigra. En la misma figura se presentan autorradiogramas representativos que muestran como la retirada de etanol disminuye las densidades ópticas encontradas en las estructuras previamente citadas.

En las figuras (Figura R-33, R-34) podemos observar el efecto de la retirada del etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo caudado-putamen, núcleo accumbens central y periférico, el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo ventromedial del hipotálamo y la amígdala central.

Las comparaciones posteriores al análisis de la varianza de una vía realizado (Figura R-33) revelaron incrementos en la expresión génica de proencefalina estadísticamente significativos en el **día 1** en el núcleo caudado-putamen (**10%**) [ $F(5,41)=9,63$ ;  $P<0,001$ ] y en el núcleo accumbens central (**12%**) [ $F(5,39)=10,55$ ;  $P<0,001$ ]. En el núcleo accumbens periférico no encontramos diferencias significativas en ninguno de los tres días en los que se realizaron los análisis. La expresión génica de la proencefalina en el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme (figura R-33), experimento una disminución significativa **3 días** después de la retirada de etanol en ambos núcleos de un **23%** en la corteza piriforme [ $F(6,46)=4,64$ ;  $P=0,027$ ] y de un **10%** en el tubérculo olfatorio [ $F(6,53)=88,56$ ;  $P<0,001$ ]. En la Figura R-31 se puede observar una disminución evidente de la expresión génica en las regiones analizadas.

La expresión génica de proencefalina en la amígdala central (Figura R-34), se redujo un **14%** a los **3 días** [ $F(5,46)=6,05$ ;  $P<0,001$ ] y un **12%** a los **7 días**, [ $F(5,46)=13,70$ ;  $P<0,001$ ]. En la Figura R-35 se muestran autorradiogramas representativos del efecto que

tiene la retirada de etanol sobre las densidades ópticas encontradas en la amígdala central.

En el núcleo paraventricular del hipotálamo la retirada de etanol produce encontrar incrementos significativos de la expresión génica de proencefalina (Figura R-34). Encontramos las diferencias a **3 días (21%)** [ $F(5,46)=13,45$ ;  $P<0,001$ ] y a **7 días (17%)** [ $F(5,46)=5,03$ ;  $P=0,005$ ]. En la Figura R-35 también podemos ver unos autorradiogramas representativos del efecto que tiene la retirada del etanol sobre las densidades ópticas encontradas en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

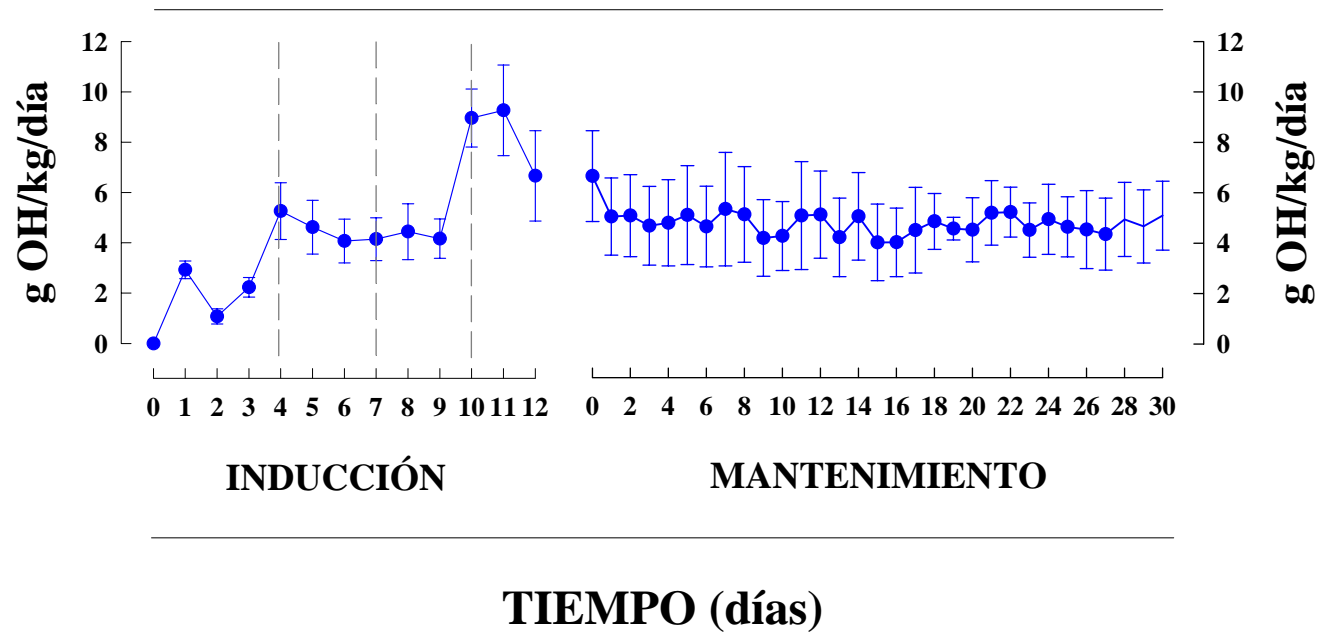
El período de abstinencia inducido por el cese del consumo de etanol provocó distintos efectos en la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado (Figura R-36) y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis (Figura R-37). En el núcleo arqueado, la retirada de etanol disminuyó el nivel de ARNm de proopiomelanocortina en un **8%** el **día 1** [ $F(3,26)=3,92$ ;  $P=0,011$ ], el **17%** el **día 3** [ $F(3,26)=7,77$ ;  $P<0,001$ ] y el **11%** el **día 7** [ $F(3,26)=4,76$ ;  $P=0,007$ ] respecto al grupo control. En el lóbulo anterior de la hipófisis, se halló también una disminución de los niveles de proopiomelanocortina del **11%** en el **día 3** [ $F(3,27)=4,65$ ;  $P=0,009$ ] y del **15%** en el **día 7** [ $F(3,27)=8,50$ ;  $P<0,001$ ] respecto al control. No se encontraron diferencias entre los días en los que se llevó a cabo el estudio en ninguna de las regiones previamente comentadas. La expresión génica de proopiomelanocortina en el lóbulo intermedio de la hipófisis tras el cese de consumo de etanol disminuyó un **15%** [ $F(3,25)=5,20$ ;  $P=0,007$ ] en el **día 1** respecto al control. Además, existe una disminución en los niveles de ARNm de prodinorfina del **día 1** con respecto a los **días 3 (27%)** [ $F(3,25)=3,37$ ;  $P=0,026$ ] y **7 (20%)** [ $F(3,25)=4,86$ ;  $P=0,006$ ]. En las Figura R-36 y R-37 se muestran secciones coronales correspondientes al núcleo arqueado y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis en las que se puede observar diferencias en las densidades halladas correspondientes a la expresión génica de proopiomelanocortina en los días en los que se desarrolla el estudio.



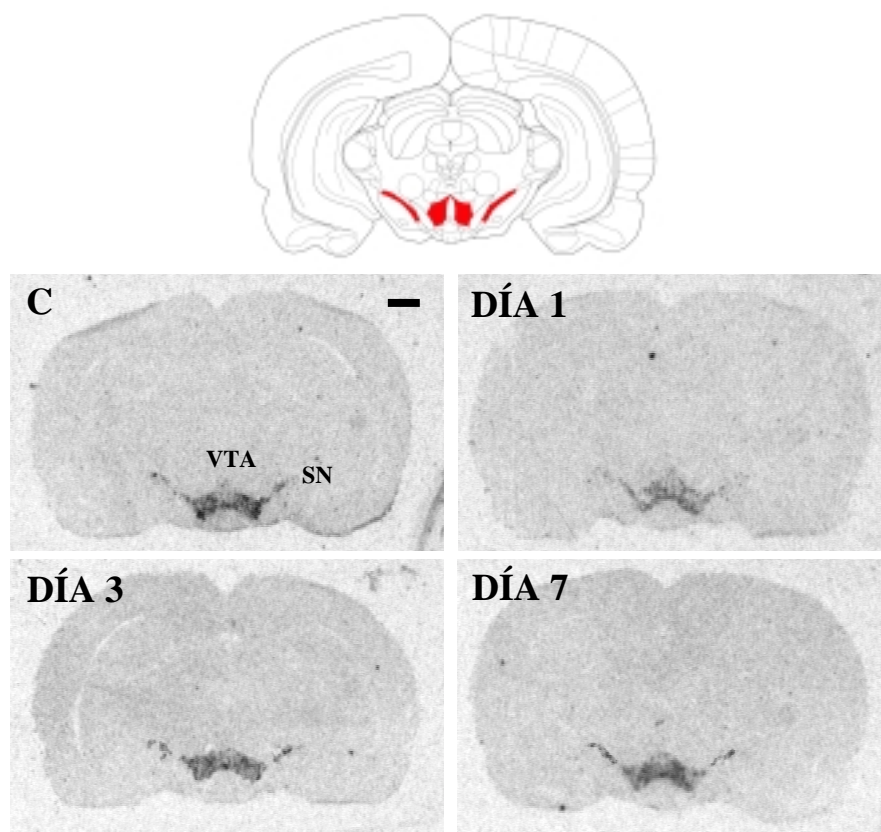
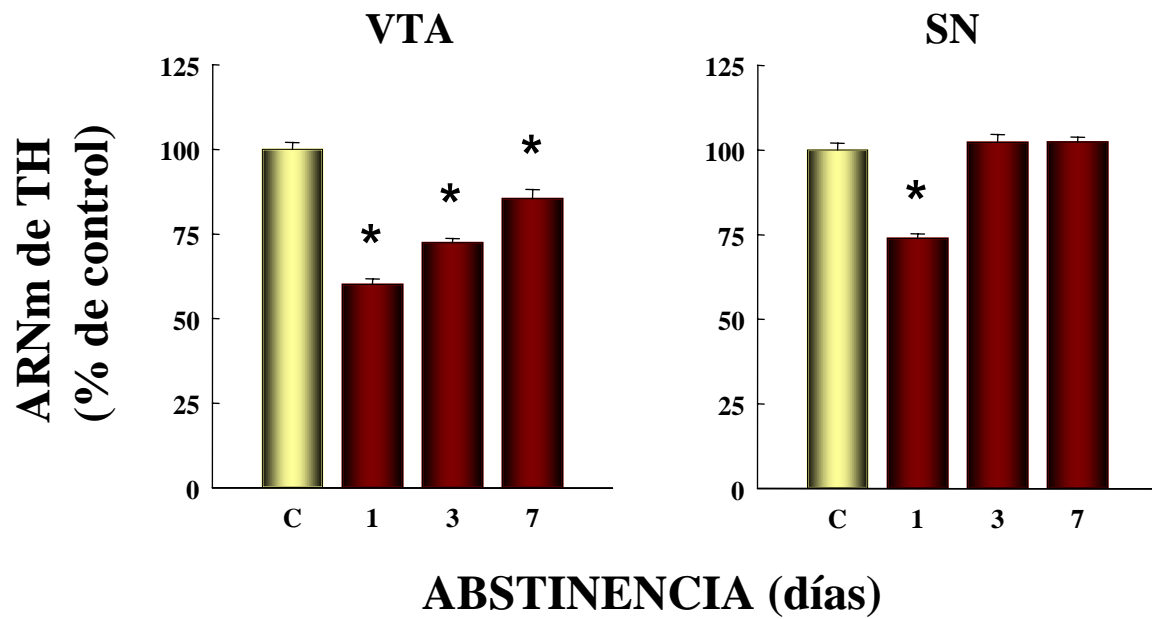
### ***5.3 Efectos del consumo crónico y voluntario de etanol sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ durante el período de abstinencia.***

Como muestra la Figura R-38, la abstinencia de etanol tras un largo período de consumo disminuyó significativamente la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO en el **día 1 (33%)** [ $F(3,24)=8,35$ ;  $P<0,001$ ], **día 3 (31%)** [ $F(3,24)=7,10$ ;  $P<0,001$ ] y **día 7 (18%)** [ $F(3,24)=3,21$ ;  $P=0,020$ ] tras el cese del consumo en el núcleo caudado-putamen y en el núcleo accumbens central [**día 1 (29%)**] [ $F(3,22)=8,58$ ;  $P<0,001$ ], **día 3 (28%)** [ $F(3,22)=6,13$ ;  $P=0,001$ ] y **día 7 (12%)** [ $F(3,22)=3,05$ ;  $P=0,044$ ]. Además, también se encontraron diferencias en el núcleo caudado-putamen y el núcleo accumbens en el día 7 con respecto al **día 1 [(18%)** ( $F(3,24)=5,02$ ;  $P<0,005$  y **(18%)** ( $F(3,22)=6,13$ ;  $P=0,001$ ] y **día 3 [(11%)** ( $F(3,24)=3,89$ ;  $P=0,012$  y **(11%)** ( $F(3,22)=2,85$ ;  $P=0,049$ ; respectivamente].

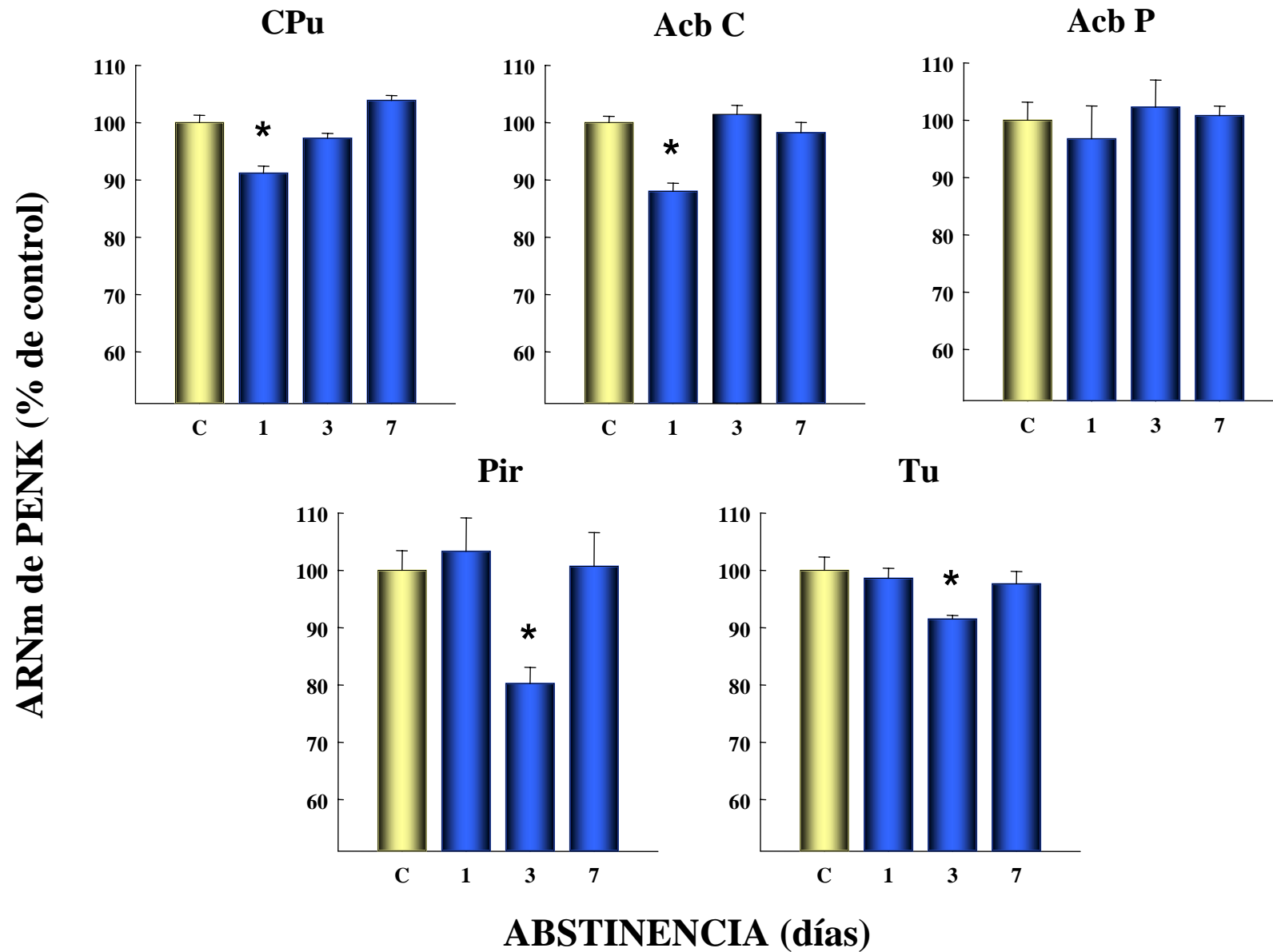
En la corteza cingulada y el núcleo accumbens periférico (Figura R-38), los resultados revelan una disminución de la fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO en el **día 1 [(26%)** ( $F(3,23)=6,16$ ;  $P<0,001$ ] y **(30%)** ( $F(3,24)=8,33$ ;  $P<0,001$ ; respectivamente]. Entre el **día 1** y los **días 3 y 7** también se encuentran diferencias significativas de un **26%** y **24%** en la corteza cingulada respectivamente [ $F(3,23)=6,95$ ;  $P<0,001$ ;  $F(3,23)=6,02$ ;  $P<0,001$ ] y de un **27%** y **33%** en el núcleo accumbens periférico [ $F(3,24)=7,53$ ;  $P<0,001$ ;  $F(3,24)=9,20$ ;  $P<0,001$ ].



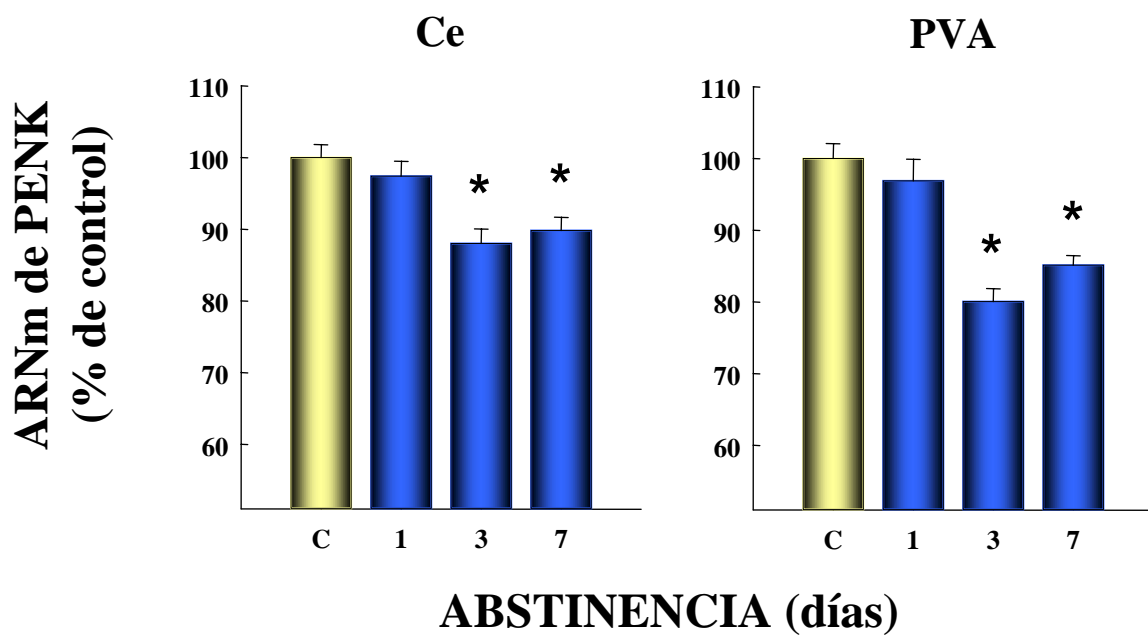
**Figura R-31.** Patrón de consumo de etanol crónico obtenido en el estudio de las alteraciones neuroquímicas debidas a la abstinencia voluntaria de etanol. Los puntos representan las medias  $\pm 1$  error estándar del consumo de la droga.



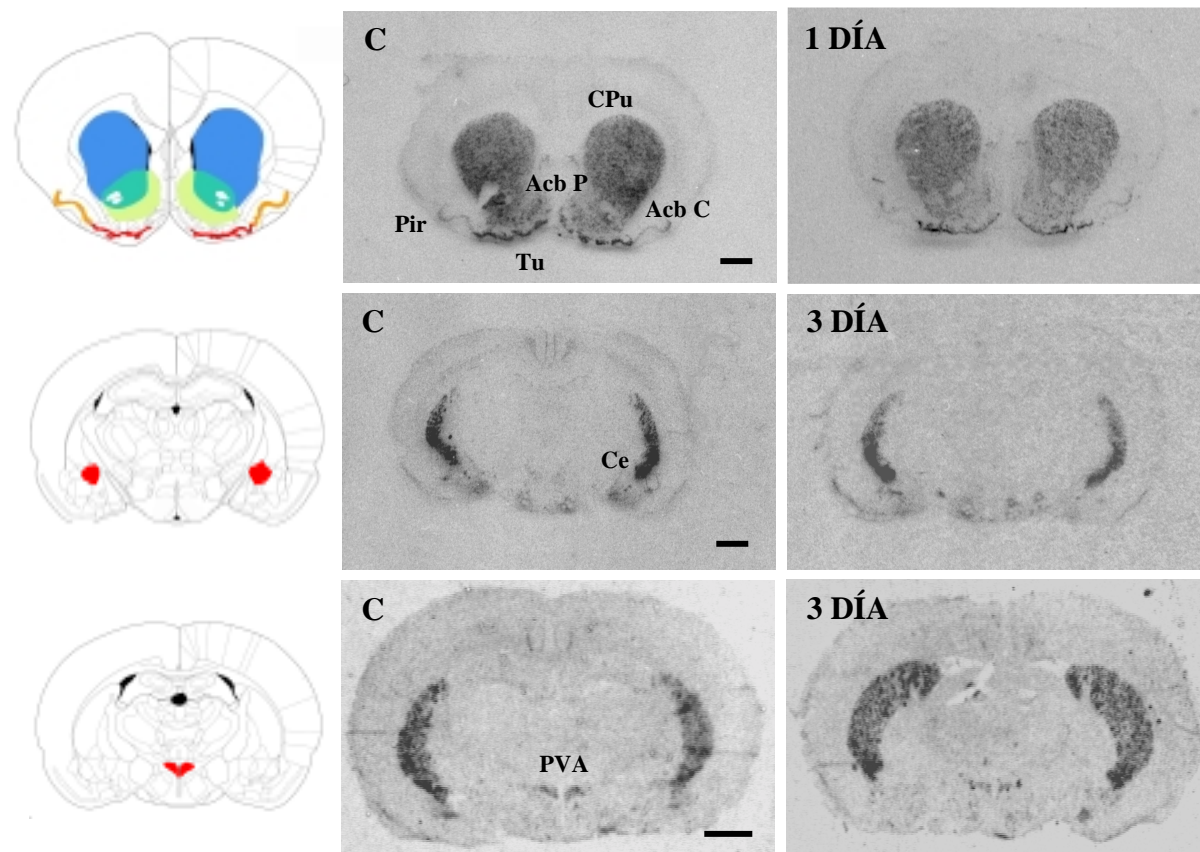
**Figura 32.** Efecto de la abstinencia del consumo de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de tirosina hidroxilasa en ambos núcleos durante el periodo de abstinencia. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra.



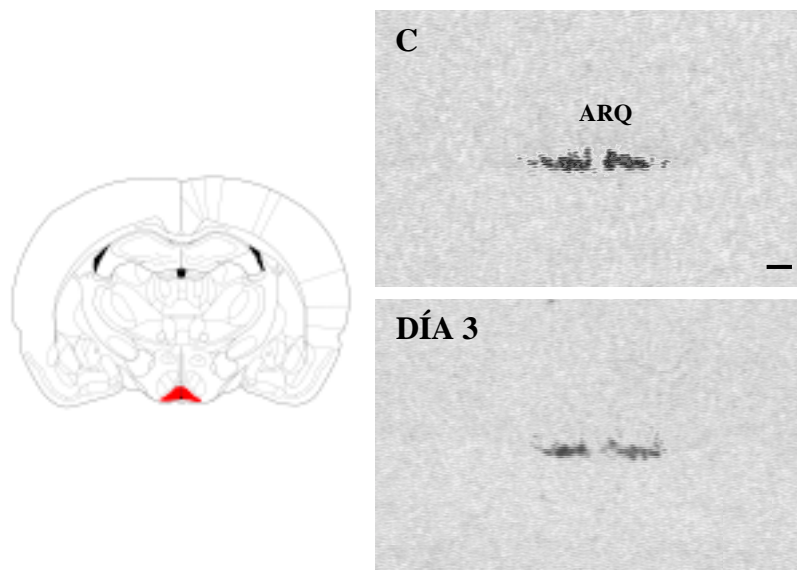
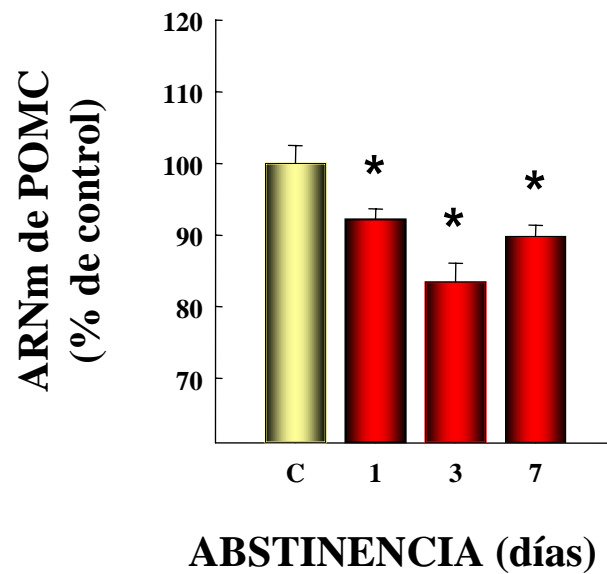
**Figura R-33.** Efecto de la abstinencia del consumo de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; PENK, proencefalina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.



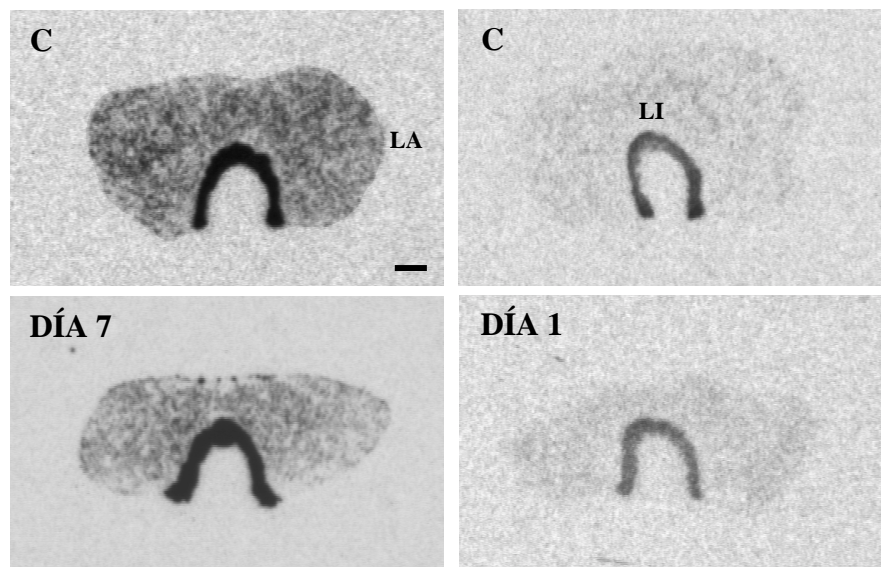
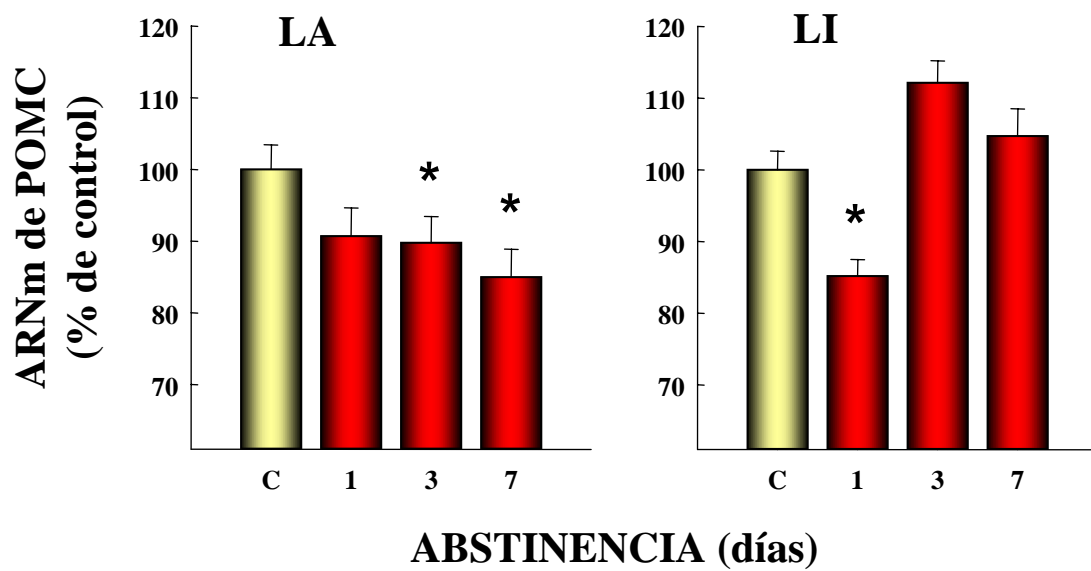
**Figura R-34.** Efecto de la abstinencia del consumo de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos paraventricular del hipotálamo y amígdala central. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. C, grupo control; PENK, proencefalina; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; Ce, amígdala central.



**Figura R-35.** Autorradiogramas representativos del efecto de la abstinencia del consumo de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, corteza piriforme, tubérculo olfatorio, amígdala central y núcleo paraventricular. Barras = 1 mm. C, grupo control; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Pir, corteza piriforme; Tu, tubérculo olfatorio; Ce, amígdala central; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo.

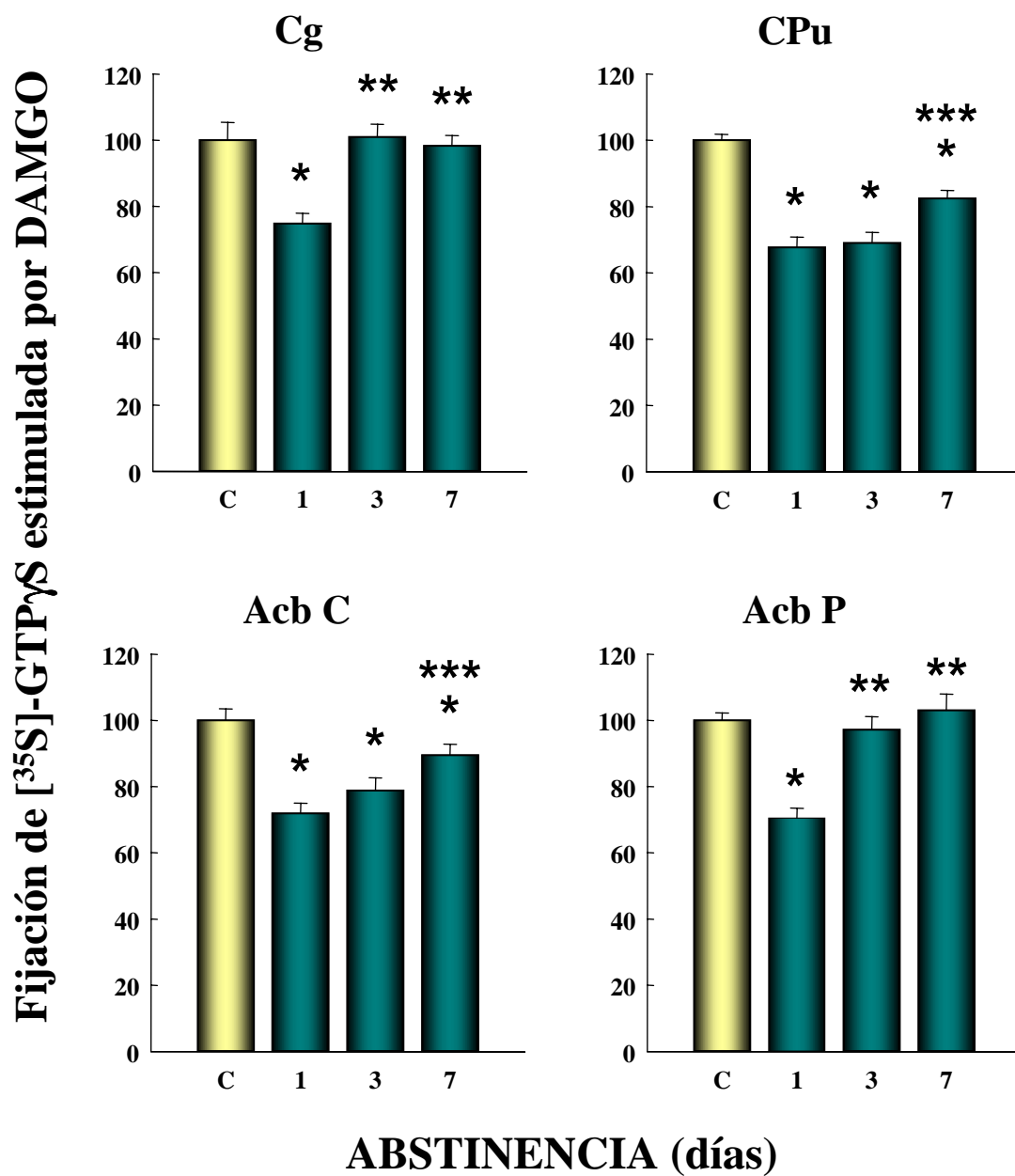


**Figura R-36.** Efecto del cese de la ingesta crónica sobre la expresión génica de proopiomelanocortina y autorradiogramas representativos en el núcleo arqueado. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1 mm. C, grupo control; POMC, proopiomelanocortina; ARQ, núcleo arqueado.



**Figura R-37.** Efecto del cese de la ingesta crónica sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control. Barra = 1mm. C, grupo control; POMC, proopiomelanocortina; LA, lóbulo anterior de la hipófisis; LI, lóbulo intermedio de la hipófisis.





**Figura R-38.** Efecto de la abstinencia del consumo de etanol sobre la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$  estimulada por DAMGO. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la fijación de  $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$  estimulada por DAMGO. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control, el símbolo \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al día 1 y el símbolo \*\*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto a los días 1 y 3. C, grupo control; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Cg, corteza cingulada.

## **6. Reducción del consumo crónico de etanol en animales preferentes inducido por la administración de naltrexona en ratas Wistar. Estudios sobre la funcionalidad de los receptores $\mu$ opioides y de la expresión génica de los péptidos opioides, tirosina hidroxilasa, transportador de serotonina, factor liberador de corticotropina y receptor cannabinoide CB1.**

### ***6.1. Patrón de consumo.***

El efecto del tratamiento con naltrexona en animales sometidos a consumo crónico de etanol se muestra en la gráfica R-39. Los datos de la conducta de ingestión resultantes fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Student Newman-Keul en cada una de las tres fases. Los factores analizados en la fase de inducción y mantenimiento fueron los grupos de animales según consumo de etanol (preferentes o no preferentes), el tiempo y la interacción entre ambos y en la fase de tratamiento fueron el tratamiento (dosis de naltrexona), el tiempo y la interacción entre ambos. En la fase de inducción los resultados revelaron una diferencia de consumo significativa entre animales preferentes (media de 2,5 g/kg/día) y no preferentes (media de 1,8 g/kg/día) en los días 9 [ $F(1,343)=3,15$ ;  $P=0,026$ ] y 12 [ $F(1,343)=3,43$ ;  $P=0,015$ ] que se corresponden con la finalización de los períodos de ingestión de 7,5% y 10%. Durante la fase de mantenimiento, tras el análisis estadístico encontramos diferencias entre los animales preferentes y no preferentes en el día 0 [ $F(1,339)=3,96$ ;  $P=0,005$ ], día 5 [ $F(1,339)=5,22$ ;  $P<0,001$ ], día 10 [ $F(1,339)=4,48$ ;  $P=0,002$ ] y día 15 [ $F(1,339)=5,85$ ;  $P<0,001$ ]. Los volúmenes medios de consumo entre ambos grupos de animales a lo largo de la fase de mantenimiento fueron de 3,3 g/kg/día en los preferentes y de 2 g/kg/día en los no preferentes. Una vez concluida la fase de mantenimiento y elegidos los animales a utilizar se comenzó con la última fase del experimento destinada a comprobar el efecto de la naltrexona sobre el consumo de etanol. En esta fase encontramos significación en

el tratamiento [ $F(1,159)=40,54$ ;  $P<0,001$ ], el tiempo [ $F(7,159)=5,43$ ;  $P<0,001$ ] y en la interacción entre ambos [ $F(7,159)=5,52$ ;  $P<0,001$ ]. Durante los primeros días de tratamiento con naltrexona no se observa efecto alguno sobre el consumo de etanol pero en el último día de tratamiento con 0,7 mg/kg de naltrexona (día 4), se produjo una disminución significativa en el consumo de etanol respecto al grupo de consumo de etanol de 1 g/kg/día [ $F(7,159)=3,63$ ;  $P=0,010$ ]. Después, utilizando la dosis de 1,4 mg/kg conseguimos hacer disminuir la ingesta de etanol de manera importante en el día 7 [ $F(7,159)=8,79$ ;  $P<0,001$ ], día 8 [ $F(7,159)=7,57$ ;  $P<0,001$ ] y día 9 [ $F(7,159)=7,10$ ;  $P<0,001$ ] llegando a ser esta reducción máxima de 1,4 g/kg/día en el día 8.

***6.2. Estudios del tratamiento con naltrexona del consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de los péptidos opioides, tirosina hidroxilasa, transportador de serotonina, factor liberador de corticotropina y receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>.***

En la figura (Figura R-40) se presentan los efectos del tratamiento con naltrexona sobre la sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra y el área ventral tegmental. Observando la gráfica del área ventral tegmental se comprueba como aquellos animales del **grupo etanol** presentan los niveles de ARNm de tirosina hidroxilasa elevados (**22%**) [ $F(3,29)=7,84$ ;  $P<0,001$ ]. Tras el tratamiento este aumento tiende a revertirse gradualmente (**11%**) [ $F(3,29)=3,93$ ;  $P=0,010$ ], si bien no de forma completa pues los niveles siguen manteniéndose elevados respecto al control un **11%** [ $F(3,29)=4,26$ ;  $P=0,006$ ]. Lo mismo sucede con la sustancia nigra, los niveles de ARNm de tirosina hidroxilasa se encuentran aumentados tanto en el **grupo etanol (30%)** [ $F(3,29)=12,18$ ;  $P<0,001$ ] como en el grupo **etanol+naltrexona (20%)** [ $F(3,29)=8,18$ ;  $P<0,001$ ] aunque en este segundo caso se puede observar claramente como el tratamiento con el fármaco redujo un **10%** [ $F(3,29)=4,49$ ;  $P=0,004$ ] la expresión génica con respecto al grupo de etanol. En la misma figura también podemos observar unos autorradiogramas representativos que muestran el efecto del tratamiento de naltrexona sobre las densidades ópticas encontradas en las estructuras previamente citadas.

En nuestro experimento de tratamiento con naltrexona durante el consumo de etanol hemos podido constatar como la expresión génica de proencefalina varía según el grupo de animales y la región analizada (Figuras R-41 y R-42). Así, se obtuvieron disminuciones de los niveles de ARNm de proencefalina tanto en el **grupo etanol** como en el grupo **etanol+naltrexona** en el núcleo caudado-putamen (**etanol vs control, 25%**;  $F(3,34)=7,07$ ;  $P<0,001$ ; **etanol+naltrexona vs control, 15%**;  $F(3,34)=4,12$ ;  $P=0,018$ ), el núcleo accumbens central (**grupo etanol vs grupo control, 40%**;  $F(3,34)=9,38$ ;  $P<0,001$ ; **etanol+naltrexona vs control, 25%**;  $F(3,34)=5,93$ ;  $P<0,001$ ), el núcleo accumbens periférico (**grupo etanol vs grupo control, 41%**;  $F(3,38)=6,21$ ;  $P<0,001$ ; **etanol+naltrexona vs control, 36%**;  $F(3,38)=5,61$ ;  $P=0,001$ ) y la amígdala central (**grupo etanol vs grupo control, 26%**;  $F(3,32)=11,28$ ;  $P<0,001$ ; **etanol+naltrexona vs control, 40%**;  $F(3,32)=18,04$ ;  $P<0,001$ ). Además, en todas las regiones anteriormente citadas hubo una reversión parcial de la disminución en la expresión génica de proencefalina después del tratamiento menos en la amígdala central en la que continuó disminuyendo la expresión génica de proencefalina del **grupo etanol+naltrexona un 15%** [ $F(3,32)=7,79$ ;  $P<0,001$ ] respecto al grupo etanol. Así, en el núcleo caudado-putamen se halló una disminución de los niveles de ARNm de PENK un **10%** [ $F(3,34)=3,12$ ;  $P=0,035$ ], en el núcleo accumbens central un **15%** [ $F(3,34)=3,66$ ;  $P=0,015$ ] y en el núcleo accumbens periférico un **5%** [ $F(3,38)=3,66$ ;  $P=0,015$ ] (Figura R-41).

En tubérculo olfatorio y la corteza piriforme, los efectos del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol fueron muy distintos (Figura 41). Mientras que en la corteza piriforme no se encontró ningún tipo de efecto con el tratamiento o el consumo propio de etanol, en el tubérculo olfatorio se detectó una disminución importante en el **grupo etanol (61%,  $F(3,26)=10,09$ ;  $P<0,001$ )** respecto al control.

Por otro lado, el consumo crónico de etanol y posterior tratamiento con naltrexona produjo un efecto distinto en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en el núcleo ventromedial del hipotálamo (Figura R-42). En el núcleo paraventricular del hipotálamo se produjo un incremento de los niveles de ARNm de proencefalina tanto en

el **grupo etanol** (61%,  $F(3,26)=10,09$ ;  $P<0,001$ ) como en el **grupo etanol+naltrexona** (60%,  $F(3,26)=8,69$ ;  $P<0,001$ ) respecto al control. En el núcleo ventromedial por el contrario disminuyó el nivel de ARNm de proencefalina en el **grupo etanol** (9%,  $F(3,31)=4,011$ ;  $P=0,022$ ) y **etanol+naltrexona** (9%,  $F(3,31)=3,79$ ;  $P=0,012$ ) frente al control. El tratamiento con naltrexona no tuvo ningún efecto sobre la expresión génica de proencefalina en estos dos núcleos.

La Figura R-43 se muestran unos autorradiogramas representativos del efecto que tiene la retirada del etanol sobre las densidades ópticas encontradas en los núcleos que expresan proencefalina.

Por lo que respecta a la proopiomelanocortina, en la figura R-44 se observa como en el núcleo arqueado se produce una disminución de la expresión del mensajero tras el consumo crónico voluntario de etanol en el grupo etanol respecto al control y al grupo etanol+naltrexona (**etanol vs control**, 11%;  $F(3,34)=3,63$ ;  $P=0,039$ ; **etanol+naltrexona vs etanol**, 9%;  $F(3,34)=3,90$ ;  $P=0,010$ ). Lo mismo ocurrió en el lóbulo anterior de la hipófisis (Figura R-45), es decir, una disminución de los niveles de ARNm de proopiomelanocortina en el grupo etanol respecto al control (**etanol vs control**, 9%;  $F(3,34)=3,67$ ;  $P=0,014$ ; **etanol vs etanol+naltrexona**, 20%;  $F(3,34)=4,82$ ;  $P=0,005$ ) sin que existan diferencias entre el grupo etanol+naltrexona y el resto de grupos. Por otro lado, en el lóbulo intermedio de la hipófisis se produjo una disminución de los niveles de ARNm de proopiomelanocortina en el grupo etanol+naltrexona con respecto al control (**etanol+naltrexona vs control**, 20%;  $F(3,27)=8,47$ ;  $P<0,001$ ) y del grupo etanol+naltrexona frente al grupo etanol (**etanol+naltrexona vs etanol**, 22%;  $F(3,27)=7,61$ ;  $P<0,001$ ). Los resultados obtenidos sobre la expresión génica de proopiomelanocortina quedan claramente reflejados por las diferencias en la señal de hibridación entre el grupo control y el resto de grupos en los autorradiogramas de las Figura R-46.

La niveles de ARNm del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en el consumo crónico y posterior tratamiento con naltrexona presentan una respuesta distinta según los núcleos cerebrales analizados (Figura R-47). El núcleo caudado-putamen, el núcleo ventromedial del hipotálamo y en el giro dentado aumentaron los niveles de ARNm en el grupo etanol y el tratamiento con naltrexona bloqueó completamente esta elevación disminuyendo los niveles de ARNm hasta valores basales. Los niveles elevados de ARNm del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> encontrados en el grupo etanol respecto al control fueron de un **35%** [F(3,31)=9,66; P<0,001] en el núcleo caudado putamen, un **17%** [F(3,32)=4,24; P=0.015] en el núcleo ventromedial del hipotálamo y un **33%** [F(3,31)=6,80; P<0,001] en el giro dentado. Las diferencias halladas entre el grupo etanol y el grupo etanol+naltrexona fueron de **39%** [F(3,31)=11,00; P<0,001] en el núcleo caudado-putamen, un **16%** [F(3,32)=4,08; P=0,007] en el núcleo ventromedial del hipotálamo y un **20%** [F(3,31)=4,29; P=0,005] en el giro dentado. Por lo que respecta a las capas del hipocampo CA1, CA2 y CA3 los resultados obtenidos de los niveles de ARNm del receptor de cannabinoide CB<sub>1</sub> varían sustancialmente. Mientras que en las capas del hipocampo CA2 y CA3 no existen diferencias entre los distintos grupos, en la capa CA1 podemos ver una disminución de los niveles de ARNm del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> tanto en el grupo etanol (**20%**) [F(3,31)=6,25; P<0,001] como en el grupo etanol+naltrexona respecto al control (**30%**) [F(3,31)=9,29; P<0,001]. Además, como se puede observar en este caso el tratamiento con naltrexona no revirtió los efectos inducidos por el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> encontrando una reducción significativa del grupo etanol+naltrexona frente al grupo etanol de un **11%** [F(3,31)=3,48; P=0,020]. En la Figura R-48 se presentan autorradiogramas representativos de las diferencias de ARNm encontradas en los distintos núcleos cerebrales descritos.

En el análisis de la expresión génica del factor liberador de corticotropina del tratamiento con naltrexona tras la ingesta crónica de etanol (Figura R-49), aparecen niveles altos de ARNm del factor liberador de corticotropina en el grupo etanol (**28%**) [F(3,21)=4,12; P=0,018] y una disminución de estos en el grupo etanol+naltrexona (**20%**) [F(3,21)=4,14; P=0,016]. En este caso el tratamiento redujo los niveles de ARNm del

factor liberador de corticotropina un **47%** respecto al grupo etanol [ $F(3,21)=9,62$ ;  $P<0,001$ ].

En nuestro experimento de tratamiento con naltrexona tras el consumo de etanol se ha podido constatar como la expresión génica de transportador de serotonina varía según el grupo experimental y la región analizada (Figuras R-50). Así, se han detectado incrementos de los niveles de ARNm del transportador de serotonina tanto en el grupo etanol como en el grupo etanol+naltrexona en el núcleo medio del rafe (**etanol vs control, 72%**;  $F(3,26)=10,42$ ;  $P<0,001$ ; **etanol+naltrexona vs control, 51%**;  $F(3,26)=7,06$ ;  $P<0,001$ ). En este núcleo, el tratamiento con naltrexona revirtió parcialmente los efectos del etanol sobre los niveles de ARNm del transportador de serotonina en un **21%** [ $F(3,26)=3,14$ ;  $P=0,037$ ]. Por lo que respecta al núcleo dorsal del rafe, encontramos un incremento de los niveles de ARNm del transportador de serotonina en el grupo etanol frente al grupo control de un **25%** [ $F(3,24)=9,09$ ;  $P<0,001$ ]. Además, el tratamiento con naltrexona redujo significativamente los niveles de ARNm del transportador de serotonina en un **30%** [ $F(3,24)=6,51$ ;  $P<0,001$ ] respecto al control con lo que la reducción de la expresión génica del transportador de serotonina entre el grupo etanol y el grupo etanol+naltrexona fue de un **55%** [ $F(3,24)=16,48$ ;  $P<0,001$ ].

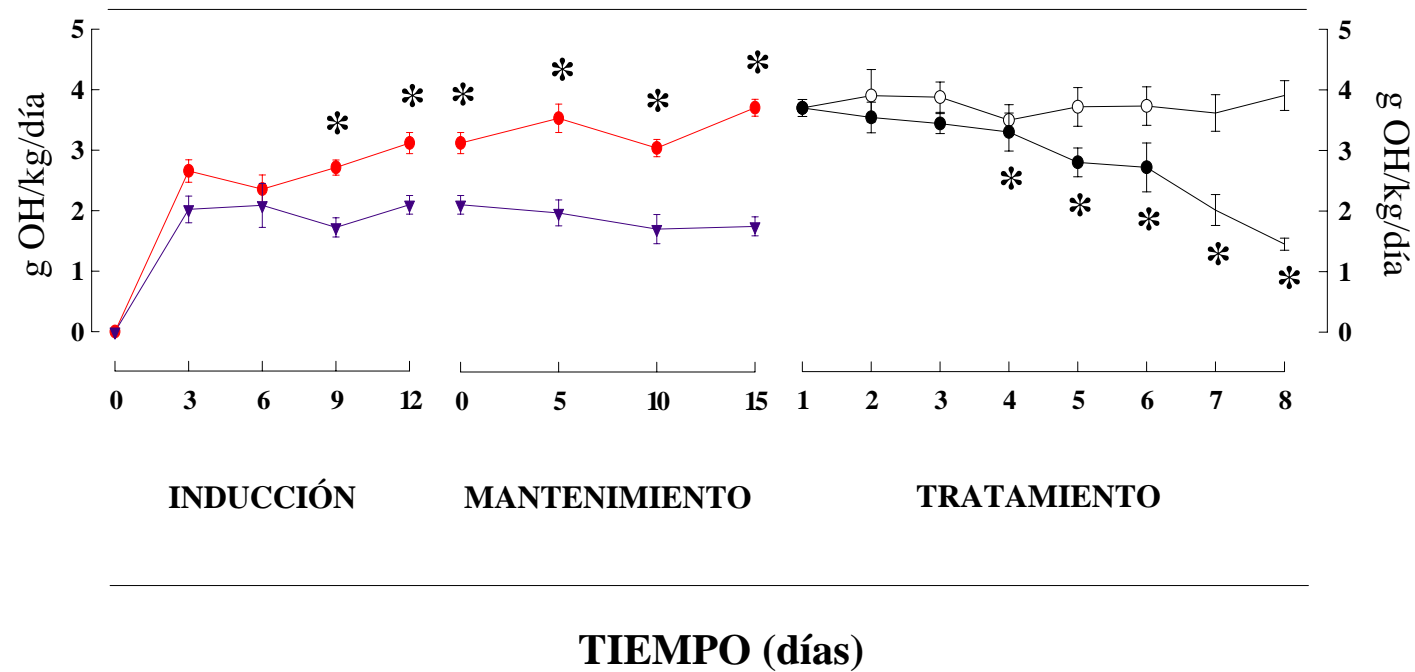
### ***6.3. Efecto del tratamiento de consumo crónico de etanol con naltrexona sobre la funcionalidad del receptor $\mu$ opioide.***

Como muestra la Figura R-51, el consumo crónico de etanol redujo los niveles de fijación de [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S estimulado por DAMGO en la corteza cingulada, el núcleo caudado-putamen, el núcleo accumbens central y el núcleo accumbens periférico con respecto al control en un **20%** [ $F(3,27)=3,88$ ;  $P=0,011$ ], **24%** [ $F(3,27)=5,24$ ;  $P=0,003$ ], **20%** [ $F(3,27)=7,64$ ;  $P<0,001$ ] y **20%** [ $F(3,27)=5,73$ ;  $P=0,001$ ] respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con naltrexona no afectó la disminución de la funcionalidad del receptor  $\mu$  debida al consumo crónico de etanol a excepción del núcleo accumbens periférico en el

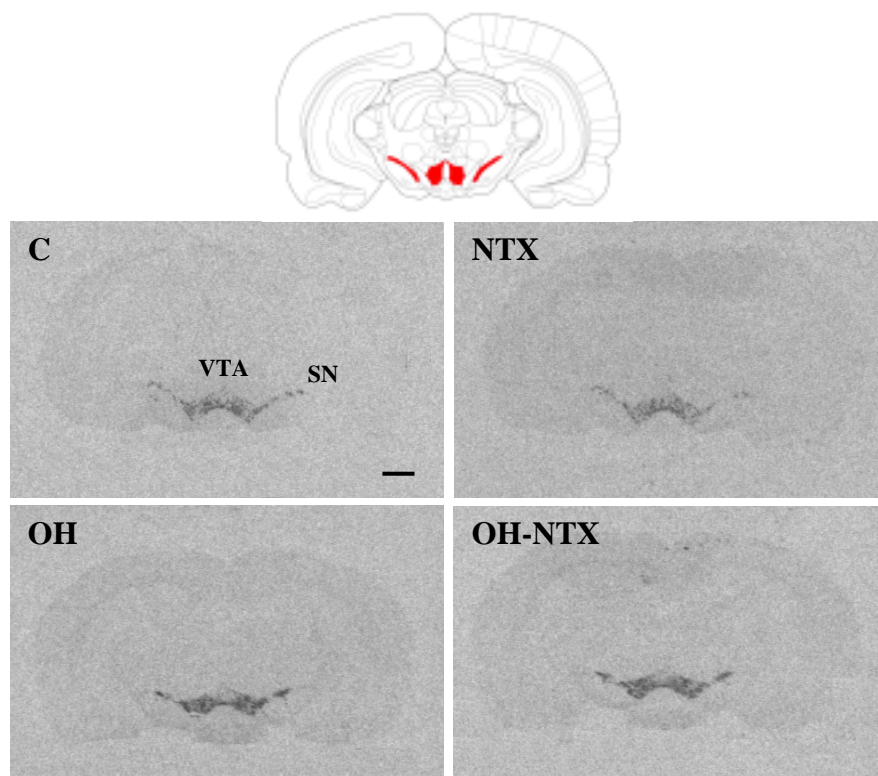
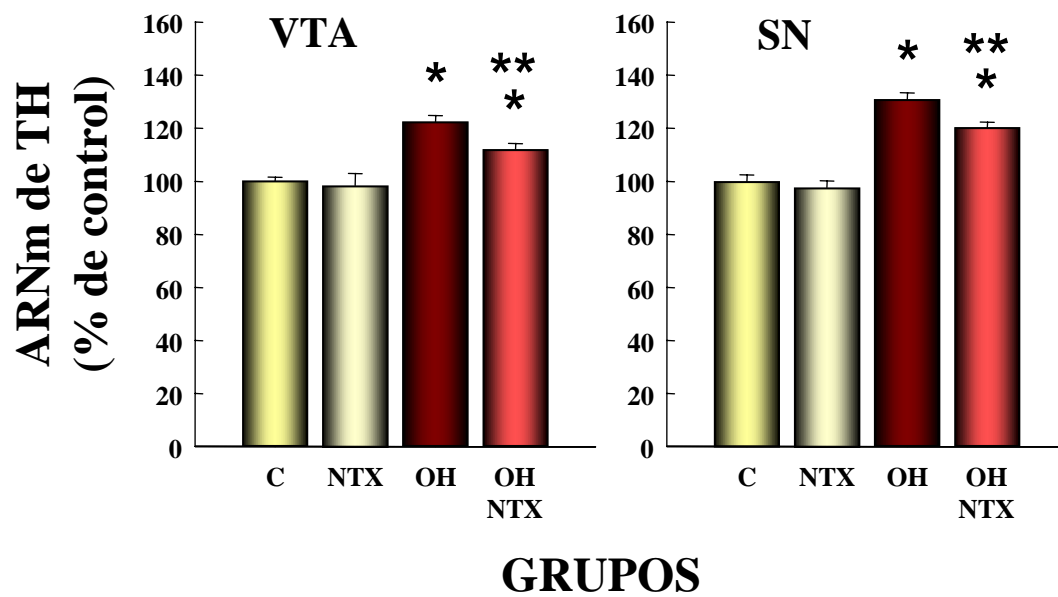
que se bloquearon completamente los efectos del consumo crónico de etanol [ $F(3,27)=5,59$ ;  $P<0,001$ ].

En la Figura R-52, se presentan unos autorradiogramas que permiten visualizar las diferencias encontradas en la funcionalidad del receptor  $\mu$  debidas al tratamiento con naltrexona.

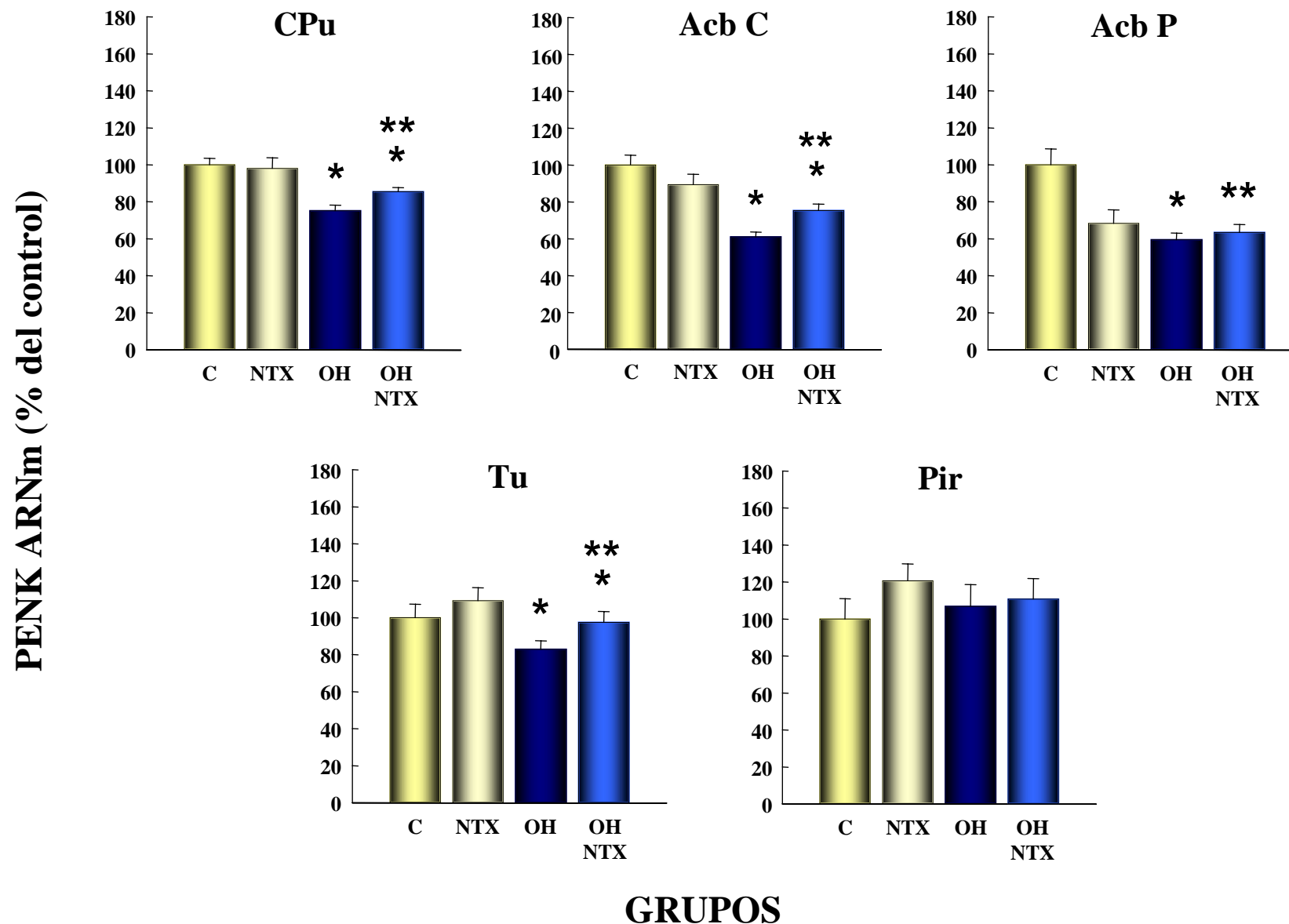




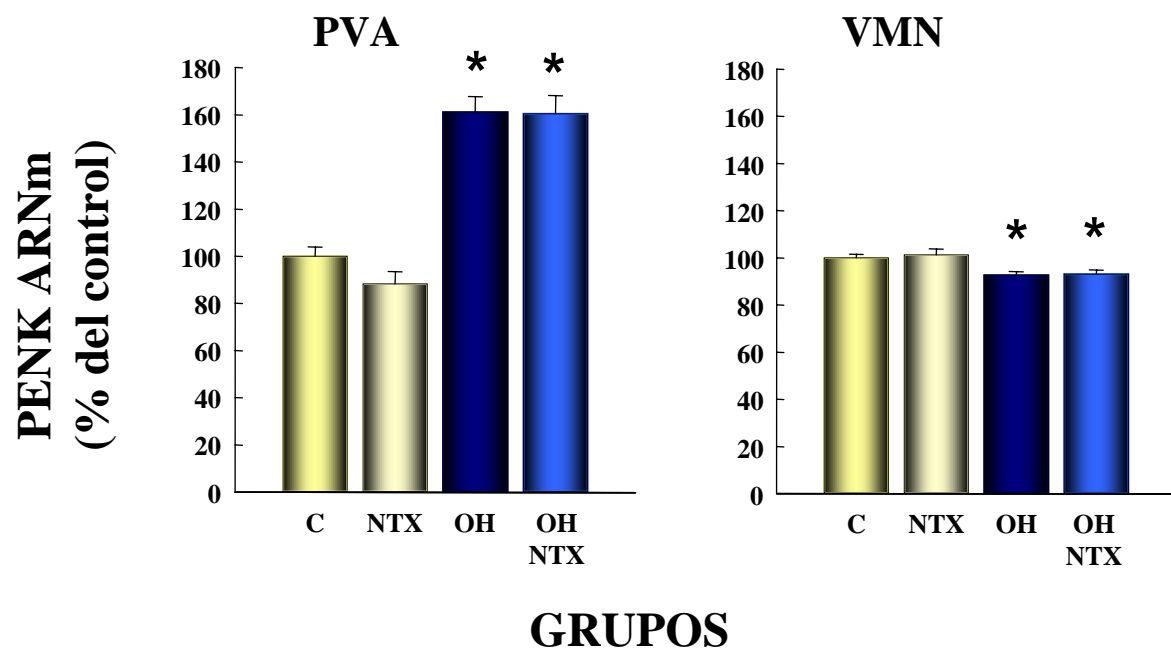
**Figura R-39.** Patrón de consumo de etanol a lo largo del experimento de tratamiento con naltrexona. Los puntos son las medias  $\pm$  1 desviación estándar. El \* indica la existencia de diferencias significativas con respecto en la inducción y la abstinencia de los animales preferentes (—●—) frente a los no preferentes (—▼—) y en la fase de tratamiento de los animales tratados con naltrexona (—●—) frente a los animales no tratados con naltrexona (—○—).



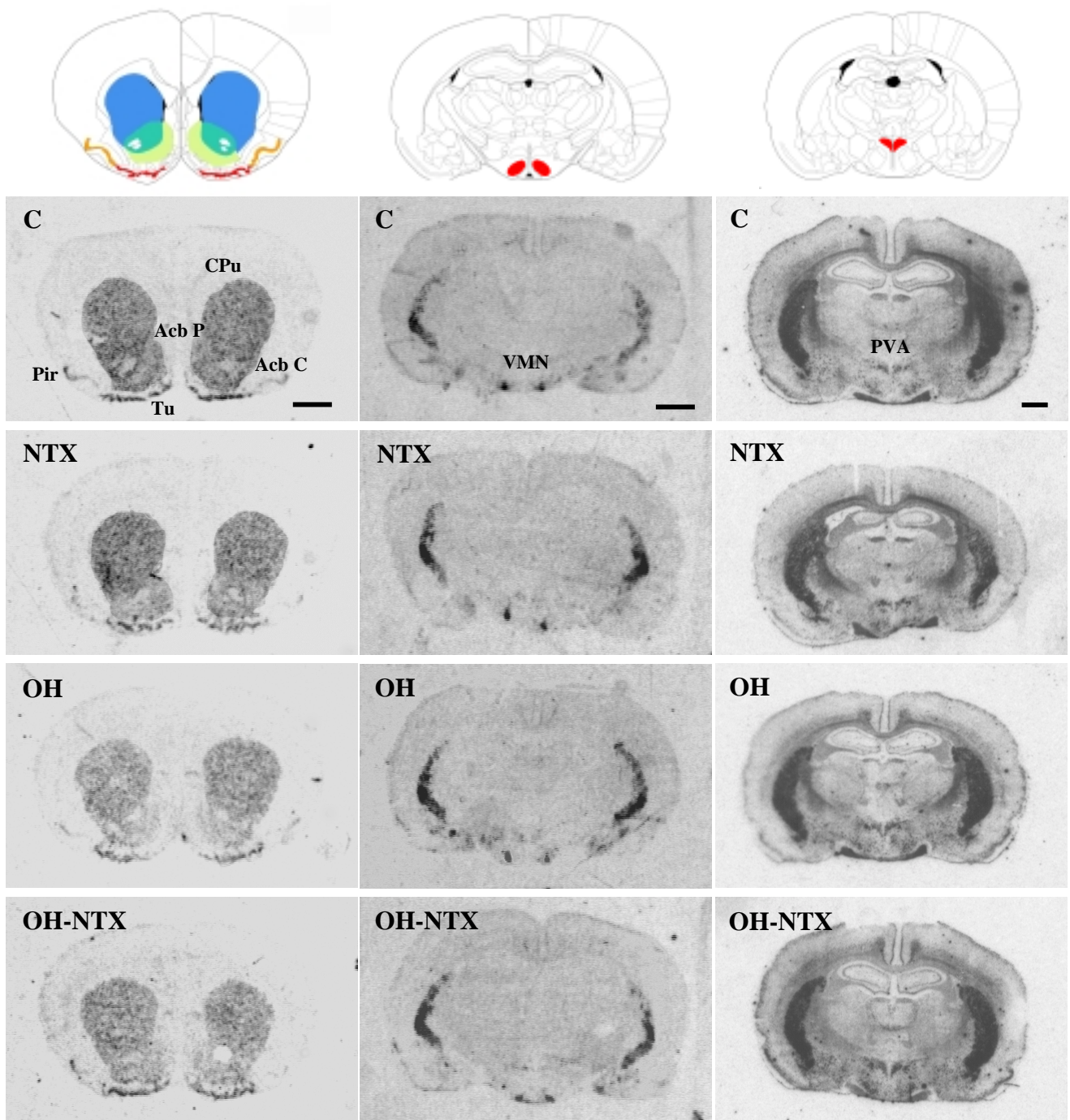
**Figura R-40.** Efecto del tratamiento con naltrexona después de la ingesta crónica de etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica de tirosina hidroxilasa tras la administración de naltrexona. Barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; TH, tirosina hidroxilasa; VTA, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra.



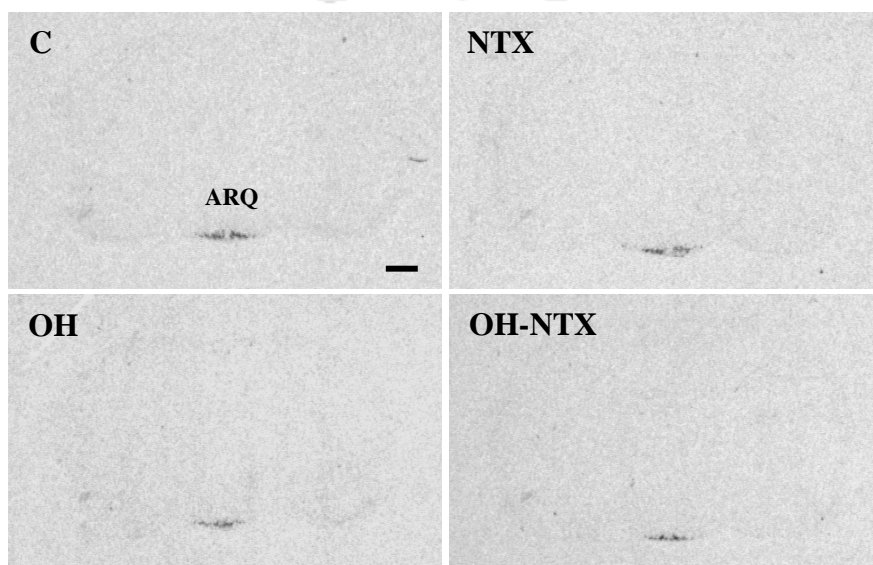
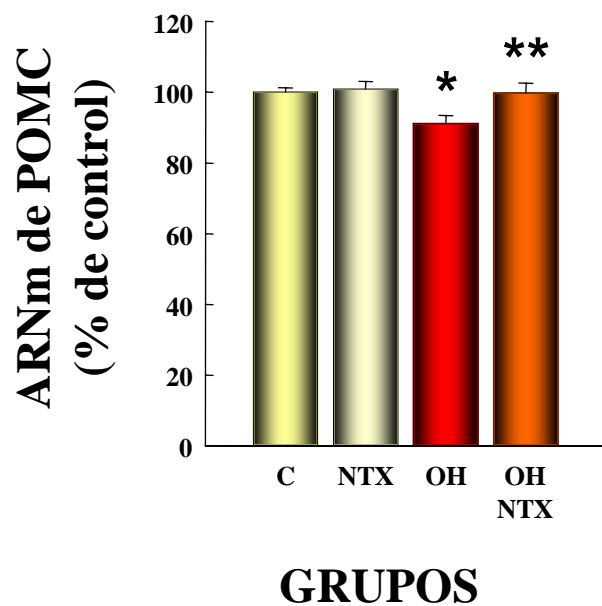
**Figura R-41.** Efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo C y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; PENK, proencefalina; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme.



**Figura R-42.** Efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en los núcleos paraventricular del hipotálamo y ventromedial del hipotálamo. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo C. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; PENK, proencefalina; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo.

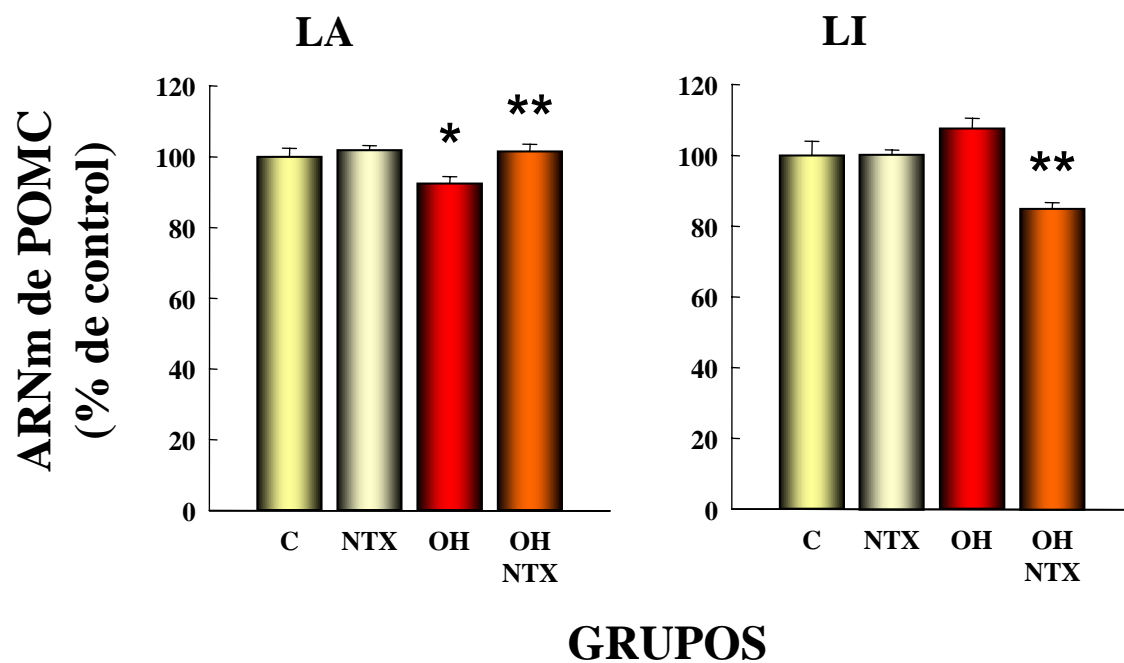


**Figura R-43.** Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales del efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo caudado-putamen, núcleo accumbens central, núcleo accumbens periférico, corteza piriforme, tubérculo olfatorio, núcleo ventromedial del hipotálamo y núcleo paraventricular del hipotálamo. Barra = 1 mm. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Pir, corteza piriforme; Tu, tubérculo olfatorio; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; PVA, núcleo paraventricular del hipotálamo.

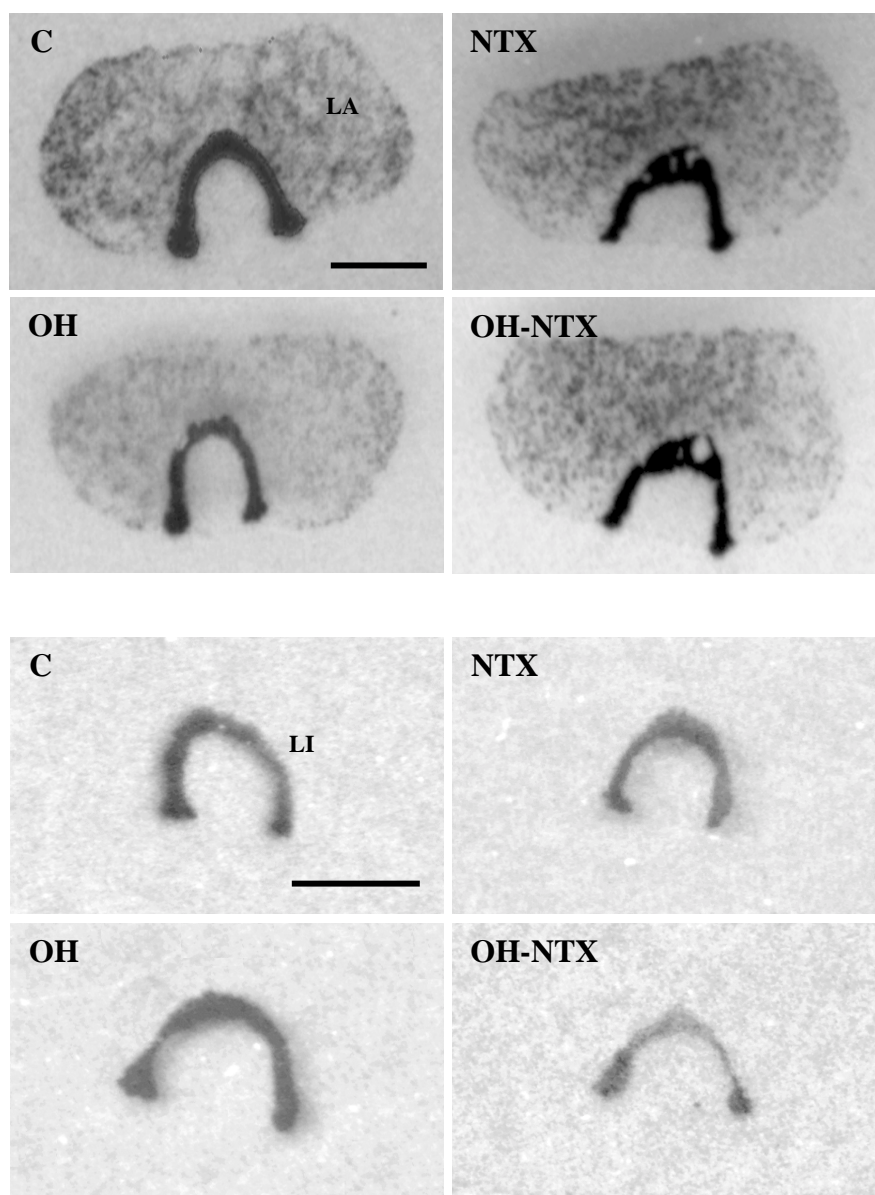


**Figura R-44.** Efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado y autorradiogramas representativos de las alteraciones en el núcleo cerebral. Las barras en la gráfica representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo C y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. En las fotos, barra = 1 mm. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; POMC, proopiomelanocortina; ARQ, núcleo arqueado.



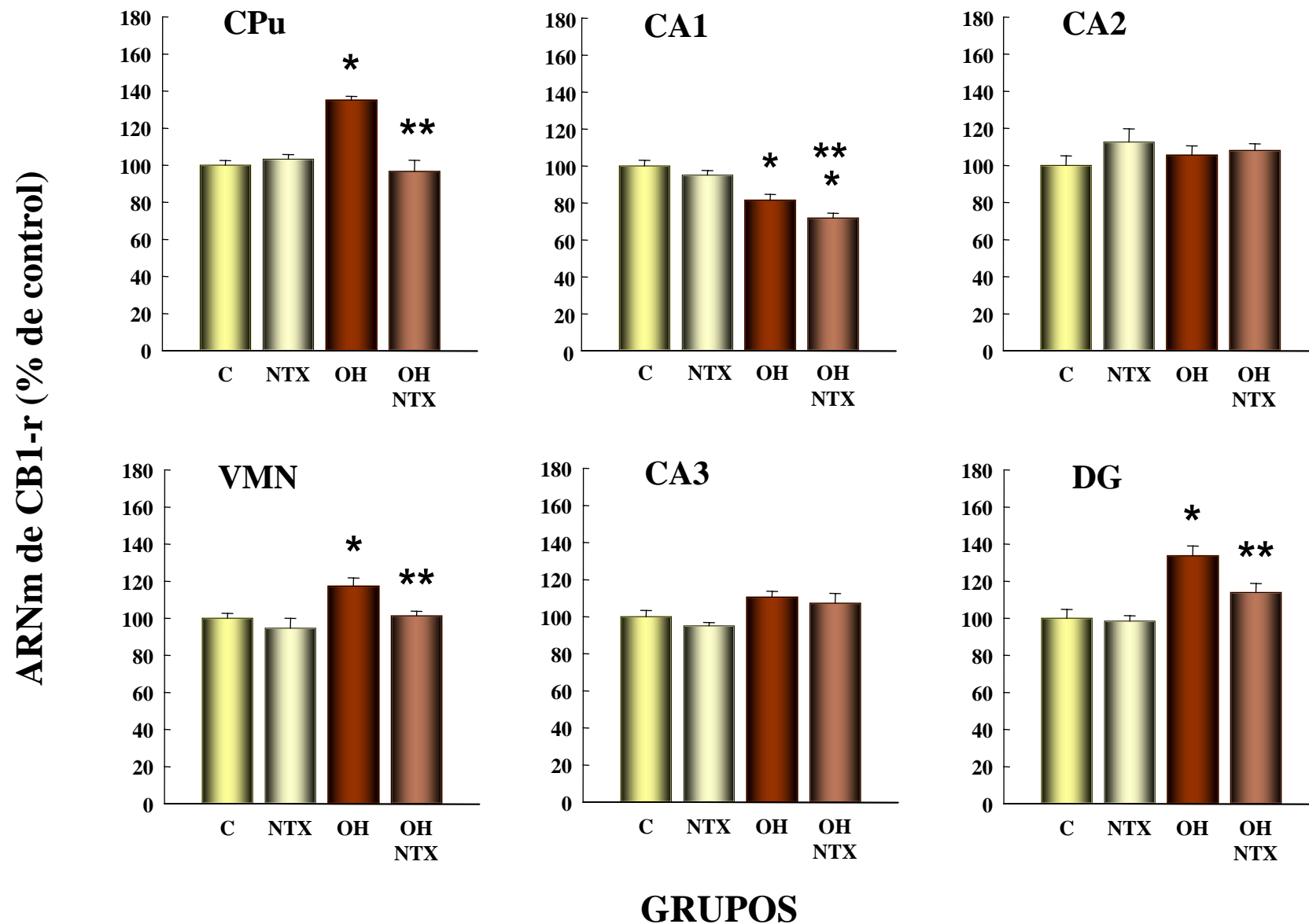


**Figura R-45.** Efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proopiomelanocortina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo C y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; POMC, proopiomelanocortina; LA, lóbulo anterior; LI, lóbulo intermedio.

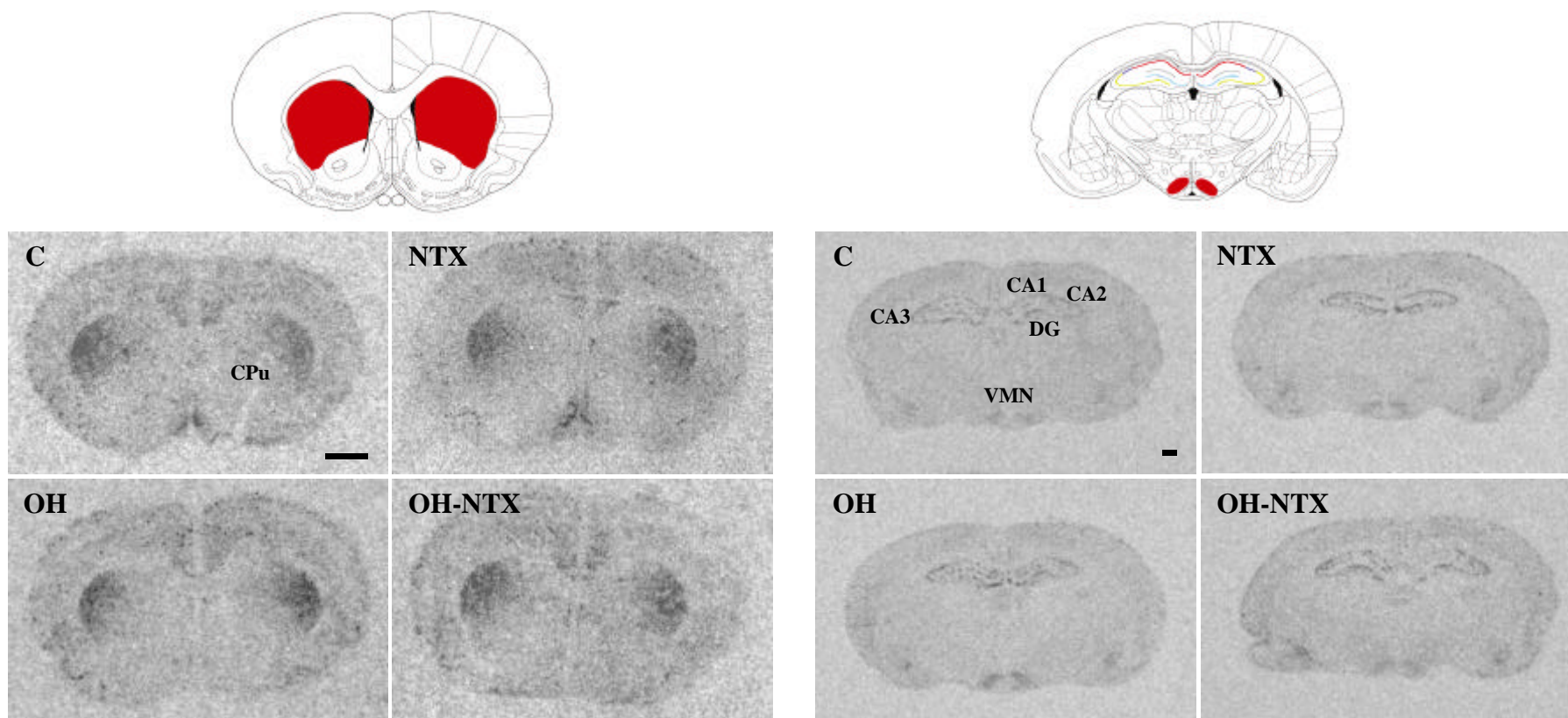


**Figura R-46.** Autorradiogramas representativos del efecto del tratamiento con naltrexona después de la ingesta crónica de etanol sobre la expresión génica de proopiomelanocortina los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Barra = 1 mm. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; LA, lóbulo anterior de la hipófisis; LI, lóbulo intermedio de la hipófisis.

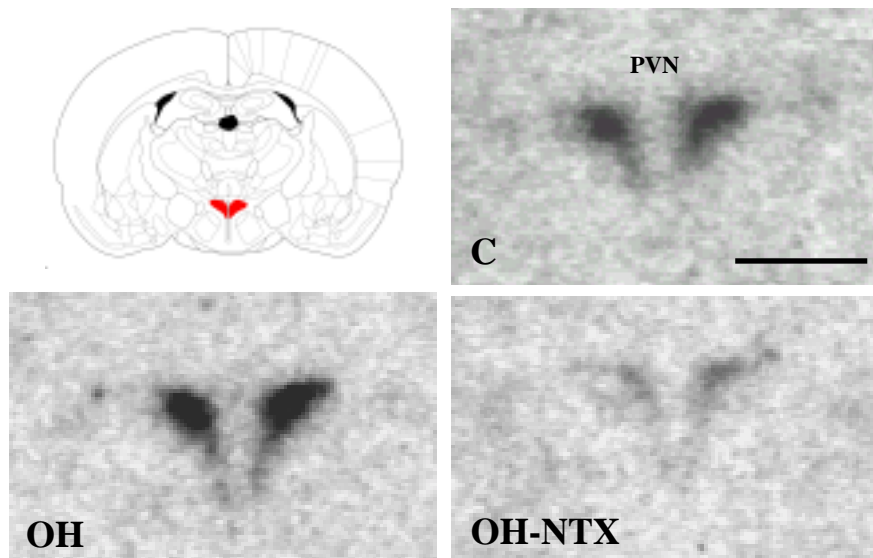
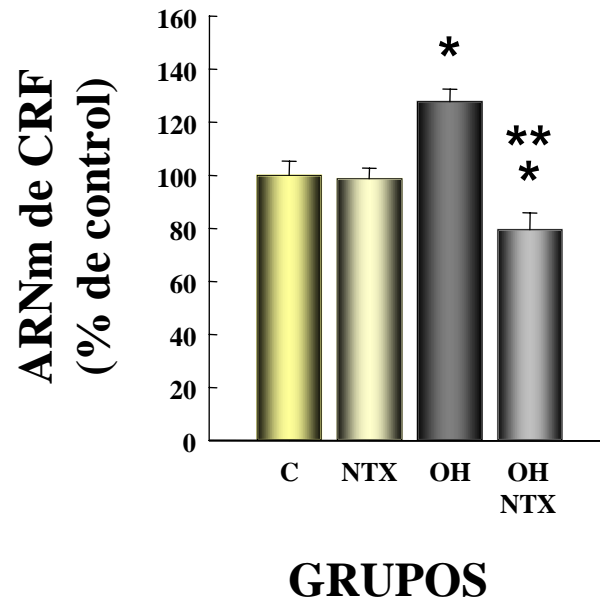




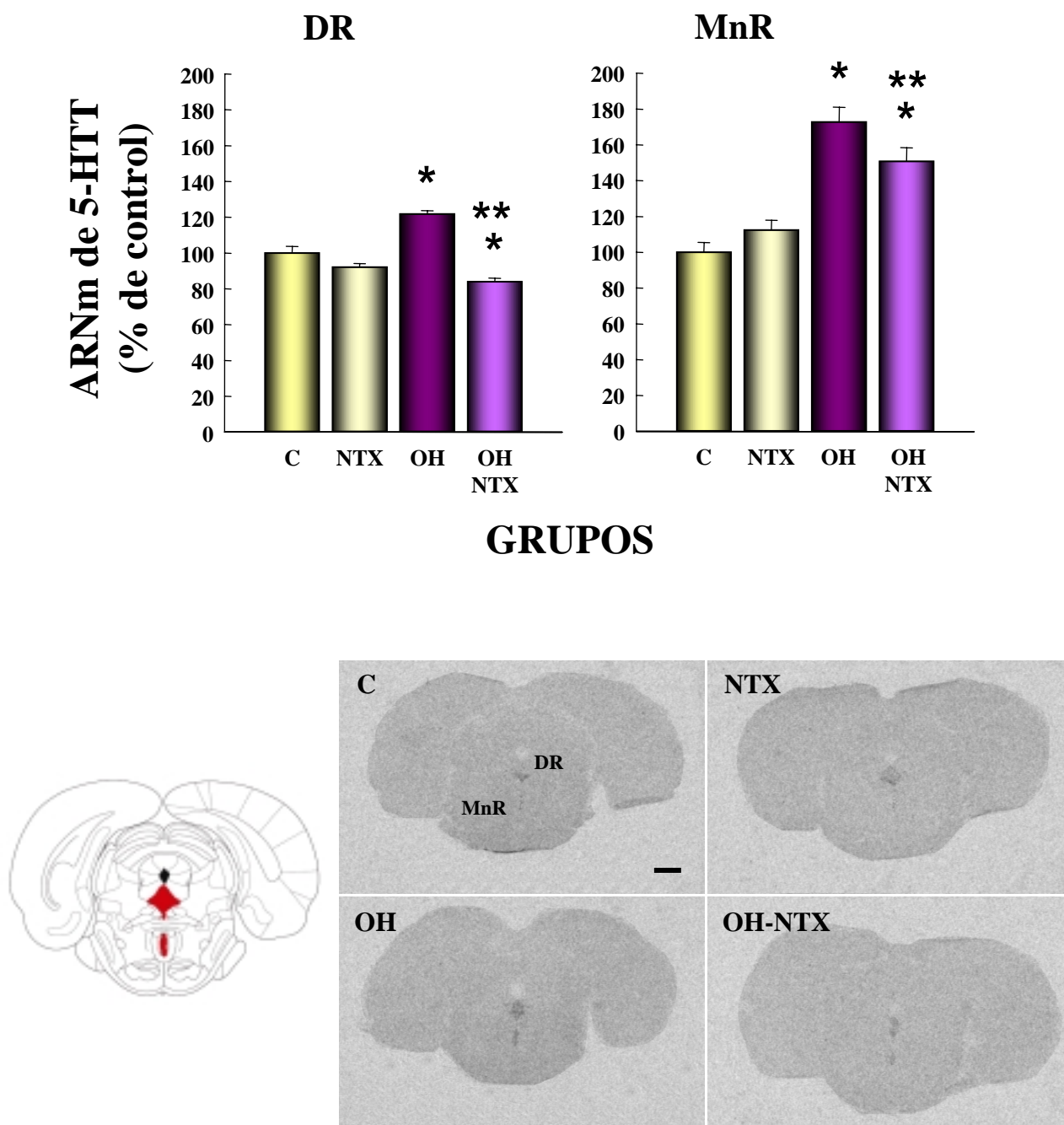
**Figura R-47.** Efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica del receptor cannabinoide CB1 en los núcleos caudado-putamen, ventromedial del hipotálamo, giro dentado y capas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica de proencefalina. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo C y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; CB1-r, receptor cannabinoide CB1; CPu, núcleo caudado-putamen; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; DG, giro dentado.



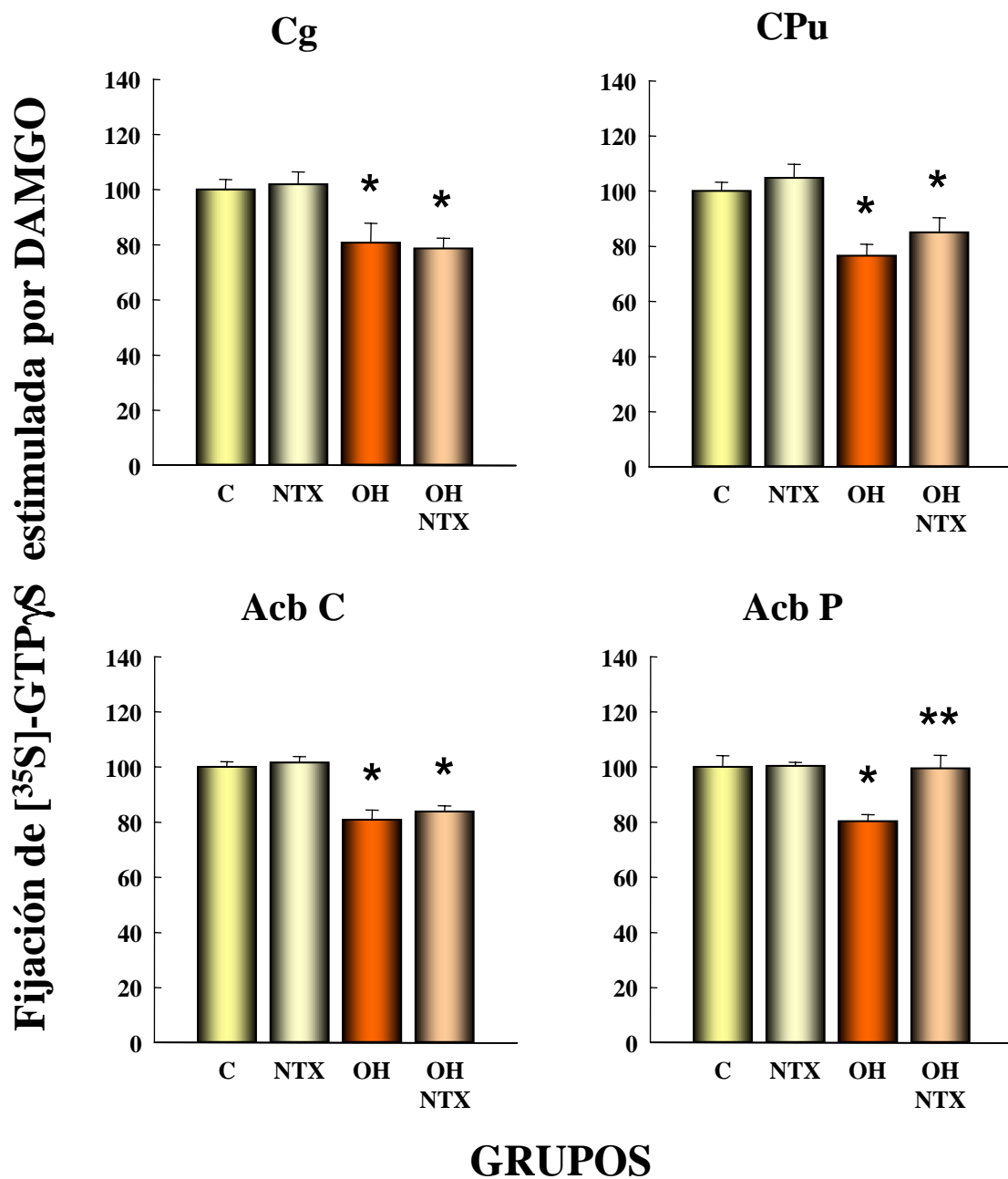
**Figura R-48.** Autorradiogramas representativos del efecto del tratamiento con naltrexona tras el consumo crónico de etanol sobre la expresión génica del receptor cannabinoide CB1 en los núcleos caudado-putamen, ventromedial del hipotálamo, giro dentado y capas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Barras = 1 mm. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; CPu, núcleo caudado-putamen; VMN, núcleo ventromedial del hipotálamo; DG, giro dentado; CA1, CA2, CA3, capas hipocampales.



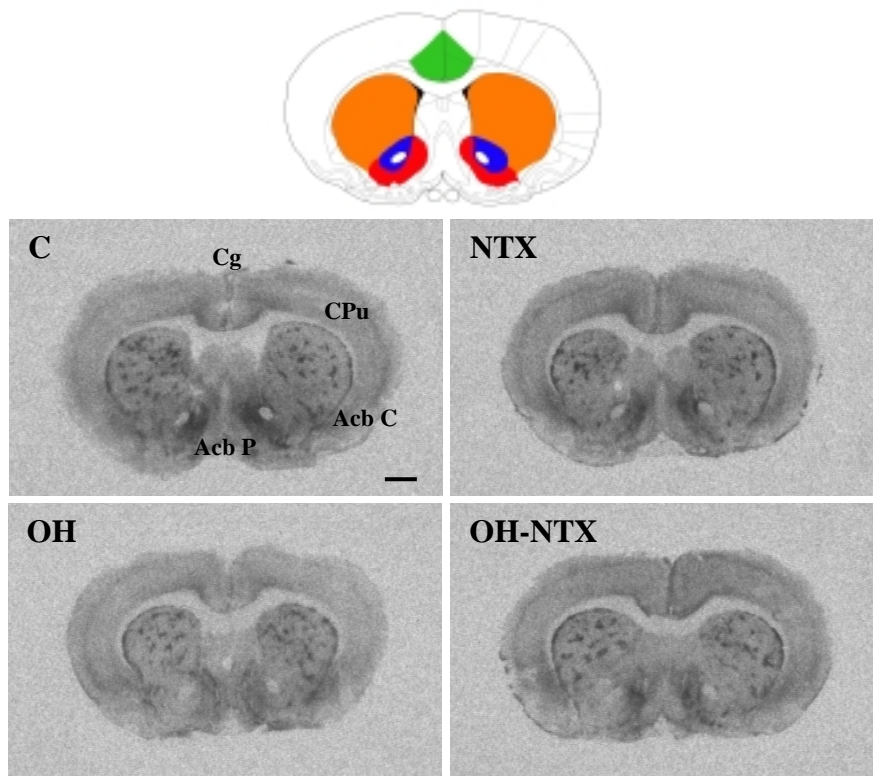
**Figura R-49.** Efecto del tratamiento con naltrexona después del consumo crónico de etanol sobre la expresión génica del factor liberador de corticotropina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y autorradiogramas representativos de secciones coronales de los niveles de ARNm en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Las barras representan las medias  $\pm$  1 error estándar de la expresión génica del factor liberador de corticotropina. En los autorradiogramas, barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y el símbolo \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; CRF, factor liberador de corticotropina.



**Figura R-50.** Efecto del tratamiento con naltrexona después de la ingesta crónica de etanol sobre la expresión génica del transportador de serotonina en los núcleos rafe dorsal y medio y autorradiogramas representativos. Las barras representan las medias  $\pm 1$  error estándar de la expresión génica del transportador de serotonina. Autorradiogramas representativos de secciones coronales cerebrales de la expresión génica del transportador de serotonina en ambos núcleos tras el tratamiento. En las fotos, barra = 1 mm. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  respecto al grupo control y \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$  del grupo OH-NTX respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX grupo control con naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo consumo etanol tratado con naltrexona; 5-HTT, transportados de serotonina; DR, núcleo rafe dorsal; MnD, núcleo rafe medio.



**Figura R-51.** Efecto del tratamiento con naltrexona sobre la fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO durante el consumo crónico de etanol. Las barras representan las medias ± 1 error estándar de la fijación de [<sup>35</sup>S]-GTPγS estimulada por DAMGO. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa a p<0,05 respecto al grupo control y el símbolo \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa a p<0,05 respecto al grupo OH. C, grupo control; NTX, grupo control de naltrexona; OH, grupo de consumo de etanol; OH-NTX, grupo de consumo de etanol tratado con naltrexona. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico.



**Figura R-52.** Autorradiogramas representativos del tratamiento con naltrexona del consumo crónico de etanol sobre la fijación de [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S estimulada por DAMGO. Barra = 1 mm. C, grupo control; NTX, grupo control de naltrexona; OH, grupo consumo de etanol; OH-NTX, grupo de consumo de etanol tratado con naltrexona. CPu, núcleo caudado-putamen; Acb C, núcleo accumbens central; Acb P, núcleo accumbens periférico; Cg, corteza cingulada.

## ***Discusión***

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados indican que el sistema opioide endógeno así como la actividad dopaminérgica (tirosina hidroxilasa) están íntimamente relacionadas con los mecanismos implicados en la dependencia alcohólica. Estos hechos quedan demostrados al estudiar la expresión génica de los péptidos opioides y de la tirosina hidroxilasa en diferentes situaciones experimentales. Así, se han analizado los efectos de la administración aguda, las diferencias comportamentales y neuroquímicas dependiendo del patrón de consumo de etanol (forzado, preferente o no preferente), la predisposición genética por el consumo de etanol (entre dos tipos de razas Wistar y Fawn-Hooded), las alteraciones curso temporales inducidas por la abstinencia espontánea al etanol y las respuestas comportamentales y sus

correspondientes correlatos neuroquímicos en ratas preferentes tratadas con el antagonista opiáceo naltrexona.

La expresión génica de la tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra aumentó en las primeras horas tras la administración aguda de etanol y disminuyó considerablemente tras el consumo crónico de etanol forzado o voluntario encontrando diferencias de la expresión génica de tirosina hidroxilasa muy interesantes entre animales con consumo preferente de etanol y animales no preferentes al igual que sucedió en el periodo de abstinencia. En el tratamiento con naltrexona tras la ingesta crónica de etanol, se observó como el fármaco bloqueó parcialmente el efecto del etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa. Esto apoya el papel fundamental de la tirosina hidroxilasa y por tanto del sistema dopaminérgico en el inicio y mantenimiento del etanol así como en la sintomatología de la abstinencia de la droga y como estas acciones puede modularse por la administración de naltrexona.

Respecto al sistema opioide endógeno, los resultados obtenidos indican que el tratamiento agudo de etanol incrementó la expresión génica de proencefalina, prodinorfina y proopiomelanocortina a distintas horas y que los tratamientos crónicos tuvieron distintos efectos en la expresión génica de proencefalina, prodinorfina y proopiomelanocortina en función del núcleo cerebral analizado. Durante la abstinencia, al igual que sucedió en los experimentos crónicos, las expresiones génicas de proencefalina y proopiomelanocortina se modificaron de manera distinta según los núcleos y los días analizados. Por otra parte, el tratamiento con naltrexona también afectó la expresión génica de proencefalina y proopiomelanocortina, normalizando los efectos producidos por el etanol en la mayoría de regiones analizadas. Los resultados obtenidos sugieren un importante papel para el sistema opioide endógeno en la ingesta de etanol, una respuesta diferencial de este sistema dependiendo del tipo de consumo y la dosis de etanol ingerida.



Durante el tratamiento con naltrexona también analizamos la expresión génica del factor liberador de corticotropina, la expresión génica del transportador de serotonina y la expresión génica del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. La naltrexona bloqueó totalmente los efectos del etanol sobre la expresión génica del factor liberador de corticotropina y parcialmente los efectos sobre la expresión génica del transportador de serotonina y la del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Tras el estudio de estos resultados se deduce que la administración de naltrexona modifica la funcionalidad de los sistemas estudiados llegando incluso a revertir los efectos del etanol lo que sugeriría la posibilidad de la utilización de otros fármacos solos o en combinación con el antagonista opioide en el tratamiento del alcoholismo.

Existen un importante número de trabajos que implican al sistema mesolímbico dopaminérgico en los efectos reforzantes en la dependencia a drogas ([Wise y Rompre, 1989](#); [Koob, 1992](#); [Di Chiara, 1995](#)). Tras la administración aguda de etanol se observa un marcado aumento en la expresión génica de tirosina hidroxilasa y por tanto una activación de la actividad dopaminérgica tanto en el área ventral tegmental como en la sustancia nigra. Este aumento de la tirosina hidroxilasa puede deberse a la excitación directa de las neuronas del área ventral tegmental y la liberación de dopamina producida tras el consumo agudo de etanol tanto en el área ventral tegmental como en el núcleo accumbens y el núcleo caudado-putamen ([Brodie y cols., 1990](#); [Gessa y cols., 1995](#); [Diana y cols., 1992](#); [Brodie y Appel, 1998](#); [Campbell y cols., 1996](#); [Kohl y cols., 1998](#); [Di Chiara e Imperato, 1988a](#); [Yoshimoto y cols., 1991](#); [Kiianmaa y cols., 1995](#); [Yim y cols., 1998](#)). Además, este aumento de la actividad dopaminérgica se produce dentro de las dos primeras horas tras el consumo de la droga retornando posteriormente a niveles basales en ambos núcleos analizados pero en distinto grado, lo que sugeriría que el sistema dopaminérgico presenta sensibilidad diferencial a los efectos iniciales del etanol en el área ventral tegmental y la sustancia nigra. Esta elevada sensibilidad del sistema mesolímbico dopaminérgico incentivaría el consumo repetido de la droga con el fin de obtener una sensación placentera continua.

Numerosas líneas de investigación sugieren que el sistema opioide endógeno está implicado en los efectos reforzantes del etanol y en su conducta adictiva (Froehlich, 1997; Herz, 1997; Ulm y cols., 1995) pues tanto los péptidos opioides endógenos como sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el circuito del refuerzo (Wamsley y cols., 1980; Lewis y cols., 1983; Dilts y Kalivas, 1989, 1990). Esta hipótesis está apoyada en estudios realizados tanto en humanos como en roedores en los que se sugiere que puede existir una cierta predisposición genética por el consumo de etanol asociada al aumento de respuesta opiodérgica inducida por el etanol (Gianoulakis y cols., 1996; Krishnan-Sarin y cols., 1998).

Los aumentos encontrados en la expresión génica de proencefalina y proopiomelanocortina tras la administración aguda de etanol están parcialmente de acuerdo con los datos presentados por otros autores. Sin embargo, los resultados obtenidos en la expresión génica de prodinorfina a nuestro entender pueden ser los primeros al no encontrarse datos en la bibliografía sobre los efectos agudos del etanol y las alteraciones que produce sobre la expresión génica de prodinorfina.

La administración aguda de etanol modificó la regulación de la expresión génica de proopiomelanocortina en el hipotálamo y la hipófisis. Mientras que en el lóbulo anterior de la hipófisis se encontraron aumentos de la expresión génica de proopiomelanocortina a medio y largo plazo, en el lóbulo intermedio y núcleo arqueado se observaron disminuciones rápidas en los niveles de ARNm de proopiomelanocortina que tendieron a normalizarse en el caso del núcleo arqueado pero manteniéndose bajos en el lóbulo intermedio de la hipófisis.

Desde un punto de vista funcional, la expresión génica de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado y el lóbulo intermedio de la hipófisis se relaciona con la biosíntesis de beta-endorfina entre otros productos mientras que en el lóbulo anterior de la hipófisis el producto postraslacional mayoritario sería la hormona adrenocorticotropa. Es bien conocido que la administración aguda de etanol produce una

marcada liberación de beta-endorfina tanto en el hipotálamo como en la hipófisis (Rasmussen y cols., 1998; Gianoulakis y Barcomb, 1987; Thiagarajan y col., 1989). Por otra parte, el lóbulo anterior de la hipófisis forma parte del sistema que controla las respuestas neuroquímicas provocadas por la presencia situaciones estresantes y que la administración aguda de etanol activa considerablemente el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Rivier y cols., 1984; Ogilvie y cols., 1997; Rivier y Lee, 1996) por lo que es probable que el aumento en la expresión génica de proopiomelanocortina encontrada en la hipófisis anterior sea debida a la respuesta del eje a la presencia de un estímulo estresante como es el etanol.

Algunas de las regiones analizadas en este trabajo están incluidas en el circuito del refuerzo constituido principalmente por el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Koob y Bloom, 1988). De hecho, se ha podido comprobar que existen proyecciones dopaminérgicas ascendentes desde las neuronas en el área A10 al núcleo accumbens, a la corteza prefrontal, a las cortezas piriforme, entorrinal y cingulada, a la parte media del septo lateral, al núcleo intersticial de la estria terminal, al tubérculo olfatorio, a la parte anterior del núcleo caudado y al complejo de la amígdala (Versteeg y cols., 1976; Fallon y Moore, 1978a, b; Fallon y cols., 1978; Moore y Bloom, 1978). Con la excepción del núcleo ventromedial del hipotálamo, el núcleo paraventricular del hipotálamo y el núcleo supraóptico, el resto de regiones examinadas se engloban dentro de este circuito del refuerzo y presentan modificaciones en la expresión génica de proencefalina y prodinorfina tras el tratamiento agudo que sugieren el papel fundamental de estos péptidos opioides en los efectos reforzantes del etanol y en su consumo abusivo. Tanto en el área ventral tegmental como en el núcleo accumbens, están presentes los receptores opioides y se expresan los genes que los codifican (McLean y cols., 1986; Mansour y cols., 1988a, 1988b, 1994a, 1994b, 1994c, 1995; Svingos y cols., 1996, 1997, 1998).

Se ha sugerido que el núcleo accumbens es un mediador fundamental en los efectos reforzantes del etanol y en su consumo compulsivo (Di Chiara e Imperato, 1988;

Koob y Bloom, 1988; Koob y cols., 1994; Weiss y cols., 1993). En este trabajo, se han analizado por separado las dos regiones en las que se puede dividir el núcleo accumbens atendiendo a su anatomía y su neuroquímica (Deutch y Cameron, 1992; Heimer y cols., 1991; Kalivas y cols., 1993). El núcleo accumbens central es parte integral del sistema estriatopalidal involucrado en el control de las funciones motoras y el núcleo accumbens periférico se encuentra relacionado con las funciones viscerales, hormonales y autónomas y en el control central en respuesta a las emociones. Con el tratamiento agudo de etanol se ha observado como se elevan la expresión génica de proencefalina y prodinorfina en todas las regiones analizadas si bien existen diferencias en el tiempo de activación y la intensidad de la respuesta sobre ambas expresiones génicas. La activación del sistema encefalinérgico en núcleos como el accumbens central, el caudado-putamen, la amígdala central o el núcleo paraventricular del hipotálamo durante la mayor parte del experimento frente otros núcleos como el accumbens periférico, la corteza piriforme y el tubérculo olfatorio o el ventromedial del hipotálamo activados al comienzo del experimento durante poco tiempo demuestra que el etanol tiene la capacidad de alterar las funciones motoras y las respuestas emocionales de forma distinta según la sensibilidad de cada núcleo analizado. Estudios llevados a cabo por otros autores han demostrado que tras la administración aguda de etanol se produce una marcada liberación de encefalinas en distintas regiones cerebrales (Schulz y cols., 1980; Seizinger y cols., 1983; Froehlich y cols., 1987). Los datos que se obtuvieron tras la administración aguda de etanol sobre la expresión génica de proencefalina corroboran estos indicios pues el aumento en la expresión génica de proencefalina encontrado puede deberse a un mecanismo adaptativo relacionado con la liberación de encefalinas. Además, estos datos están de acuerdo con aquellos encontrados por de Gortari y cols. (2000) y Li y cols. (1998). Este aumento generalizado de la actividad encefalinérgica podría formar parte de un mecanismo neurobiológico que aumentase el efecto placentero del etanol contribuyendo de esta manera a su consumo compulsivo. No se han hallado, sin embargo, datos en la bibliografía de los efectos que tienen la administración aguda de etanol sobre la expresión génica de prodinorfina de manera que los datos que se presentan en este trabajo pueden ser los primeros en este sentido. El sistema

dinorfinérgico se encuentra implicado en la adquisición de la preferencia de la ingesta de la droga (Sandi y cols., 1988, 1990) y en la reducción del consumo de etanol debido a la reducción de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens provocada por la activación de los receptores  $\kappa$  opioides en el sistema mesolímbico dopaminérgico (Kuzmin y cols., 1997; Narita y cols., 1993; Shippenberg y cols., 1996; Lindholm y cols., 2001; Nestby y cols., 1999) lo que implica a este sistema en los efectos reforzantes del etanol. El aumento de la expresión génica de prodinorfina encontrado en el núcleo accumbens y el núcleo caudado-putamen tras la administración aguda de etanol podría deberse a la existencia de una marcada liberación de dinorfina y/o péptidos derivados que permita la disminución del tono dopaminérgico inducido por la liberación de endorfinas y encefalinas que permitiese modular la actividad del sistema mesolímbico dopaminérgico reduciendo de esta manera, los efectos reforzantes del etanol.

Los datos de expresión génica de proencefalina y prodinorfina hallados en este trabajo en los núcleos paraventricular y ventromedial del hipotálamo y el núcleo supraóptico sugieren una clara diferenciación regional y temporal de los efectos agudos del etanol. Estos núcleos están implicados en las respuestas al estrés y la ingesta entre otras funciones (Young y Lightman, 1992; Li y cols., 1997; Jamshidi y Taylor, 2001) que se alteran drásticamente tras el consumo de etanol (Rivier y cols., 1984; Ogilvie y cols., 1997a, b; Rivier y Lee, 1996; Zoeller y cols., 1992; Millerschoen y Riggs, 1969; Collins y cols., 1992; Thiagarajan y cols., 1989; Zhou y cols., 2000). Por tanto, la activación de la expresión génica de proencefalina y prodinorfina en los núcleos supraóptico ventromedial y paraventricular del hipotálamo podría representar parte de una respuesta integradora a los efectos estresantes de la administración aguda de etanol. El hecho de que en estos núcleos el aumento de la expresión génica se produzca en torno a los dos horas y se mantengan durante buena parte del experimento supone el mantenimiento de los efectos estresantes a lo largo del tiempo lo que podría influir en el aumento del consumo de etanol.

En los experimentos crónicos se han evaluado los efectos del consumo de etanol a largo plazo. Los resultados obtenidos permiten concluir que tanto las dosis de etanol ingeridas como el patrón de consumo presentan alteraciones sobre las expresiones génicas de los péptidos opioides y la tirosina hidroxilasa. Al hablar de patrones de consumo (forzado, preferente y no preferente) se hace referencia a la voluntariedad del consumo de etanol. De esta manera, podemos estudiar el efecto farmacológico del etanol (forzado) y la influencia de la conducta (preferente) en los datos neuroquímicos obtenidos. En los tres patrones de consumo estudiados (agudo, forzado y voluntario), las dosis de ingesta de etanol variaron considerablemente pero estas diferencias no se reflejaron sobre las expresiones génicas de los péptidos opioides y la tirosina hidroxilasa en algunas de las regiones analizadas. Esto permite sugerir la importancia de las dosis de etanol ingeridas en los efectos neuroquímicos finales del etanol.

En el análisis realizado sobre la actividad del sistema dopaminérgico se constata la diferente regulación de la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y en la sustancia nigra. Mientras que en la sustancia nigra no se observan diferencias entre los distintos grupos de consumo crónico de etanol demostrando así que la adaptación experimentada por el sistema motor nigrostriatal es independiente de la cantidad de etanol ingerida no sucede lo mismo en el área ventral tegmental. En este área, la disminución de los niveles de ARNm de tirosina hidroxilasa y por consiguiente de la actividad dopaminérgica son mayores en los animales de consumo preferente en comparación con los animales no preferentes y forzados lo que está en consonancia con los datos hallados por [Rothblat y cols. \(2001\)](#) en tratamientos crónicos utilizando el método de la dieta líquida de Lieber. Estos resultados sugieren que el sistema mesolímbico dopaminérgico de los animales del grupo preferente presenta mayor sensibilidad a los efectos del etanol y que la conducta de administración del etanol participa de manera activa en sus efectos reforzantes, así como en los procesos neuroadaptativos del sistema mesolímbico dopaminérgico.

Los resultados de este trabajo, revelan una reducción de la expresión génica de proopiomelanocortina en los grupos en los que la dosis de etanol ingerida fue mayor (forzado y preferente) en el núcleo arqueado y el lóbulo anterior de la hipófisis. Esto hace suponer que estos tres núcleos que expresan proopiomelanocortina presentan una regulación independiente entre sí y que además las mayores cantidades de etanol consumido regulan de manera diferente la funcionalidad de cada uno de ellos.

Los datos obtenidos de la expresión génica de proencefalina y prodinorfina en los estudios crónicos sugieren que el etanol actúa de forma diferente en los núcleos cerebrales. Se ha podido observar que los núcleos relacionados con el refuerzo presentan una respuesta distinta a los relacionados con los que controlan las respuestas fisiológicas al estrés, de manera que los efectos reforzantes y neuroendocrinos del etanol se regulan de distinta manera en presencia de etanol. La ingesta crónica de etanol disminuye la liberación de encefalina y dinorfina en diversas regiones cerebrales ([Lucchi y cols., 1984](#); [Schulz y cols., 1980](#); [Seizinger y cols., 1983](#); [Nylander y cols., 1984](#); [Cowen y cols., 1998](#); [Cowen y Lawrence, 2001](#)) por lo que es probable que la disminución de la expresión génica de proencefalina y prodinorfina se deba a una respuesta neuradaptativa de ambos sistemas por el consumo continuado de etanol. Las dosis elevadas de etanol ingerido junto a la mayor sensibilidad del sistema dopaminérgico en los grupos forzado y preferente, podría aumentar la liberación de dopamina en los núcleos implicados en el refuerzo, regulando, negativamente, la expresión génica de proencefalina y prodinorfina.

En los resultados hallados en los núcleos paraventricular del hipotálamo y supraóptico los resultados obtenidos difieren completamente con respecto a los núcleos del circuito del refuerzo tanto en la expresión génica de proencefalina como en la de prodinorfina. Esto sugiere que la regulación de las expresiones génicas en ambos grupos son independientes de las dosis de etanol ingeridas y del consumo voluntario. En este núcleo las expresiones génicas de ambos péptidos se incrementan en los experimentos de consumo crónico y voluntario no encontrando tampoco diferencias entre los grupos preferente y no preferente. Para los animales preferentes, la mayor actividad de los sistemas

encefalinérgico y dinorfinérgico podría contribuir a un mayor consumo y al mantenimiento en el consumo del etanol en un intento de reducir sus efectos estresantes y aversivos.

Los receptores opioides en roedores, primates y humanos están implicados en los efectos agudos y crónicos del consumo de etanol aunque el mecanismo por el cuál mantienen su consumo no está del todo claro. El consumo crónico de etanol provoca el aumento de receptores  $\mu$  opioides en los núcleos relacionados con el circuito del refuerzo (Cowen y Lawrence, 1999; Cowen y cols., 1999) y la carencia del receptor  $\mu$  en animales impide el consumo de etanol utilizando técnicas de auto administración oral (Roberts y cols., 2000). Los resultados encontrados en este trabajo, de acuerdo con otros autores (Chen y Lawrence, 2000; Sim-Selley y cols., 2002; Saland y cols., 2004), señalan la existencia de disminución en la unión a receptores  $\mu$  por desacoplamiento del receptor a las proteínas G tras la estimulación con DAMGO en animales forzados, preferentes y no preferentes. Estos hallazgos sugieren que la presencia de dosis mínimas de etanol son suficientes para modificar la funcionalidad del receptor  $\mu$  y que por tanto, la conducta de consumo en el caso del receptor  $\mu$ , no es un factor fundamental para este efecto.

En estudios llevados a cabo en razas de animales preferentes y no preferentes para el consumo de etanol, se han observado diferencias en el sistema mesolímbico dopaminérgico y en el sistema opioide endógeno tanto en su actividad basal como en su respuesta a la administración de etanol (George y cols., 1991; Casu y cols., 2002; Morzorati, 1998; Stefanini y cols., 1992; Crabbe y cols., 1981; Gianoulakis y Gupta, 1986; de Waele y cols., 1992; de Waele y Gianoulakis, 1994; Gianoulakis y cols., 1992; Fadda y cols., 1989, 1990; Weiss y cols., 1993; Gatto y cols., 1994; Gulya y cols., 1993; Cowen y Lawrence, 2001; Chen y Lawrence, 2000). Estos resultados corroboran los resultados obtenidos en este trabajo en lo que respecta a las diferencias de respuesta obtenida tanto por del sistema dopaminérgico como del sistema opioide endógeno entre los grupos de animales preferentes y no preferentes para el consumo de etanol. Además, en los estudios de vulnerabilidad por el consumo de etanol entre las razas Wistar y Fawn-Hooded realizados también se encontraron diferencias basales en el sistema opioide



endógeno. Los resultados obtenidos sobre la expresión génica basal de proencefalina y proopiomelanocortina y la funcionalidad del receptor  $\mu$  están de acuerdo con los publicados por otros autores ([Cowen y Lawrence, 2001](#); [Chen y Lawrence, 2000](#)).

Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren la existencia de variaciones en la sensibilidad y el umbral de excitabilidad en los sistemas neuroquímicos estudiados lo que apoyaría la hipótesis de las implicaciones genéticas de la adicción a etanol. Aquellos sujetos que genéticamente estuvieran afectados por estas alteraciones serían más vulnerables a los efectos del etanol. El estudio de estas diferencias genéticas permitiría la identificación de genes que predispongan a la dependencia por el etanol posibilitando el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Uno de los pasos para alcanzar el cese del consumo abusivo de etanol es sobrepasar el período de abstinencia y evitar las recaídas que se producen durante este período. Durante esta fase, el consumidor crónico de etanol sufrirá una serie de signos y síntomas característicos de la abstinencia. Existen una amplia variedad de modelos animales que permiten el estudio del síndrome de abstinencia y en nuestro trabajo hemos utilizado ratas de raza Fawn-Hooded como modelo animal de estudio de este proceso. Esta decisión se fundamenta en que estos animales, presentan un elevado consumo voluntario de etanol, alcanzan niveles suficientes de etanol durante el tratamiento crónico por lo que la retirada de etanol puede inducir alteraciones neuroquímicas detectables ([Chen y cols., 1998](#); [Cowen y cols., 1999a](#); [Rezvani y cols., 1990, 1991](#)).

Durante la fase de abstinencia por el etanol se produjeron modificaciones importantes tanto en la actividad opiodérgica como dopaminérgica. Estas modificaciones en los sistemas muestran un patrón de respuesta distinto según el núcleo estudiado y el tiempo transcurrido desde el cese de consumo del etanol.

La expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra sugieren una regulación distinta entre el circuito del refuerzo y la

actividad locomotora. La aparición de la abstinencia a etanol disminuye la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental (Diana y cols., 1992; Shen y Chiodo, 1993; Diana y cols., 1996) y los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (Rossetti y cols., 1992; Weiss y cols., 1996) tanto a corto como a largo plazo. La disminución de la expresión génica de tirosina hidroxilasa encontrada durante todo el período de abstinencia en nuestro trabajo está en consonancia con la disminución de la actividad dopaminérgica general encontrada por otros autores. La modulación terapéutica de la función dopaminérgica disminuiría el riesgo de recaídas y por tanto favorecería el proceso de abandono definitivo de la droga.

Los péptidos opioides endógenos se encuentran implicados en las alteraciones neuroquímicas que se desarrollan durante la abstinencia aunque los mecanismos celulares que regulan estos procesos aún no están del todo claros. Inicialmente, se produce estrés, ansiedad, irritación, alteraciones del humor, aumento de presión arterial, somnolencia y alteraciones metabólicas debido en parte a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Rivier, 1996; Eskay y cols., 1995) y el sistema opioide endógeno. (Carr y cols., 1990; Millan y Emrich, 1981; Rossier y cols., 1977; Volpicelli, 1987).

En tratamientos crónicos de etanol la beta-endorfina disminuyó en el plasma durante la abstinencia (Przewlocka y cols., 1994; Hutchinson y cols., 1988; Gianoulakis y cols., 1988) y aumentó en el núcleo accumbens utilizando microdialisis (Zangen y Shalev, 2003). En el período de abstinencia se encontraron niveles bajos de ARNm de proopiomelanocortina a tiempos cortos en el lóbulo intermedio y en todo el período de abstinencia en el lóbulo anterior de la hipófisis y el núcleo arqueado al igual que sucede en los estudios llevados a cabo por Przewlocka y cols. (1994) y Scanlon y cols. (1992). Esto supone la existencia de un mecanismo de regulación distinta en la expresión génica de proopiomelanocortina en el tiempo en el núcleo arqueado y en ambos lóbulos de la hipófisis, lo que sugiere que cada una de estas estructuras necesitan un tiempo diferente para adaptarse a la nueva homeostasis.

Durante el período de abstinencia también se producen variaciones en la actividad encefalinérgica. La administración crónica de etanol aumentó la encefalina cerebral (Plotkin y cols., 1998; Plotkin y cols. 1997; Plotkin y cols., 2001) sin encontrar modificaciones en los niveles de ARNm de proencefalina (Przewlocka y cols., 1994; Plotkin y cols., 1998; Plotkin y cols., 1997; Plotkin y cols., 2001). Sin embargo, Cowen y Lawrence (2001), encontraron disminuciones en la expresión génica de proencefalina en el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio y un aumento en la amígdala central en ratas FH tras dos semanas de abstinencia. Estos datos no coinciden con los presentados en esta Tesis puesto que los niveles de ARNm de proencefalina se muestran disminuidos en el núcleo caudado-putamen, núcleo accumbens central, corteza piriforme y tubérculo olfatorio a corto plazo retornando a niveles basales a largo plazo. En los experimentos de Plotkin y cols. (1997, 1998 y 2001) los animales utilizados fueron ratones WSR/WSP y no ratas FH y se utilizó el método de la dieta líquida en vez del método preferencial para la administración del etanol. Las diferencias con el experimento de Cowen y Lawrence (2001), fueron la administración de etanol al 5% alterna con períodos de abstinencia y tratamiento con naltrexona y el tiempo de las determinaciones de la expresión génica de proencefalina (14 días vs 1, 3, o 7 días).

En este trabajo también se ha analizado la funcionalidad de los receptores  $\mu$  durante la abstinencia. Tras la retirada del consumo de etanol, se observó que la funcionalidad de los receptores  $\mu$  disminuía de manera significativa en las regiones cerebrales estudiadas tras 24 horas del cese del consumo. Además, esta disminución de la funcionalidad del receptor opioide se mantuvo en el núcleo caudado-putamen y el núcleo accumbens central mientras que en el resto de regiones se normalizó esta funcionalidad tras 3 días de cese de consumo del etanol. Recientemente, se han llevado a cabo experimentos para dilucidar el papel de los receptores  $\mu$  durante la abstinencia. Djouma y Lawrence (2002) han demostrado el aumento en la densidad de receptores durante el periodo de abstinencia en ratas FH sometidas a un tratamiento crónico utilizando el método preferencial de dos botellas y Chen y Lawrence (2000) mostraron la existencia de una disminución en la funcionalidad de los receptores  $\mu$  dos días después de la retirada

de etanol coincidiendo estos resultados con los presentados en este trabajo de investigación. Los resultados sugieren que las alteraciones encontradas tras el tratamiento crónico de etanol presentan una secuencia temporal distinta según los núcleos analizados lo que supondría la existencia de diferentes sensibilidades y regulaciones en estas regiones. Cabe esperar también que estas diferencias temporales en la funcionalidad del receptor  $\mu$  supongan el control diferencial de los núcleos en el mantenimiento de los efectos adversos de la abstinencia y el deseo de consumo de etanol durante largo tiempo. Estos hallazgos sugerirían la utilización de herramientas farmacológicas dirigidas a modular la funcionalidad del receptor  $\mu$  que permitiesen la reducción de los efectos adversos del cese de consumo de etanol y del deseo de consumo y búsqueda compulsiva de la droga.

La ingesta prolongada de etanol en el tiempo produce adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y conductuales en un individuo. La aparición de fármacos cuyo uso permita la recuperación de la funcionalidad basal alterada por el consumo de etanol facilitaría considerablemente la desaparición de la dependencia. En los últimos años, los antagonistas de los receptores opioides han demostrado su eficacia en la reducción del consumo de etanol en animales y humanos ([Altshuler y cols., 1980](#); [Froehlich y cols., 1987, 1990](#); [O'Malley y cols., 1992](#); [Samson y Doyle, 1985](#); [Volpicelli y cols., 1986, 1992, 1995](#)). Sin embargo, poco se sabe de los efectos neuroquímicos que produce el tratamiento con naltrexona durante la reducción del consumo de etanol sobre el sistema opioide endógeno y los sistemas dopaminérgicos. En este trabajo se ha observado que el tratamiento con naltrexona modifica la conducta de consumo de etanol y las alteraciones neuroquímicas inducidas por su consumo sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa, de los péptidos opioides endógenos y de la funcionalidad del receptor  $\mu$  opioide.

La naltrexona reduce eficazmente el consumo de etanol en animales de experimentación (Figura R-40) a partir del cuarto día de tratamiento hasta su finalización. Esta reducción del consumo puede deberse al aumento de dosis de

naltrexona (de 0,7 a 1,4 mg/kg), a la acumulación del fármaco tras el tratamiento inicial o a la duración del tratamiento. La elección de la dosis se realizó tomando como referencia las dosis terapéuticas utilizadas en la práctica clínica habitual de manera que comenzamos con 0,7 mg/kg. Esto significa que en nuestro modelo la dosis efectiva de tratamiento para la reducción del consumo de etanol duplicó la dosis terapéutica utilizada. A la vista de estos resultados se podría pensar que la utilización de dosis terapéuticas superiores a las actualmente administradas podrían redundar en un mayor beneficio para el paciente en su intento de reducir paulatinamente el consumo de etanol.

Se ha observado que el tratamiento con naltrexona modifica selectivamente las alteraciones neuroquímicas encontradas durante el consumo crónico de etanol, sugiriendo papeles distintos para los núcleos y sistemas neuroquímicos analizados en el mantenimiento de la dependencia. El tratamiento con este antagonista opioide redujo los incrementos inducidos por el etanol sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa, del receptor CB1, factor liberador de corticotropina y transportador de serotonina en sus distintos núcleos de expresión.

Los niveles de ARNm de proencefalina en núcleos motores alterados por el consumo de etanol tendieron a normalizarse pero sin afectar a los núcleos hipotalámicos. La expresión génica de proopiomelanocortina se normalizó en el núcleo arqueado y lóbulo anterior de la hipófisis y la funcionalidad del receptor  $\mu$  solo alcanzó niveles basales en el núcleo accumbens periférico después de la reducción de esta tras el consumo crónico de etanol.

Los resultados sobre la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y la sustancia nigra sugieren la regulación de la actividad dopaminérgica mesolímbica por parte del sistema opioide endógeno a través de los receptores  $\mu$  opioides y en menor medida de los receptores  $\delta$  presentes en los núcleos que conforman el sistema mesolímbico. Esta disminución parcial de la actividad dopaminérgica en el

sistema mesolímbico podría reducir los efectos reforzantes del etanol y favorecería la reducción del consumo de etanol. Esta conclusión se apoya en resultados que demuestran que la administración de naltrexona tras tratamientos crónicos de etanol bloquea la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Middaugh y cols., 2003; Gonzalez y Weiss, 1998; Benjamín y cols., 1993).

Tras el tratamiento con naltrexona se ha observado como la disminución en la expresión génica de proopiomelanocortina inducida por el consumo de etanol se normaliza en el núcleo arqueado y el lóbulo anterior de la hipófisis. Esta normalización se debe probablemente a que el bloqueo de los receptores  $\mu$  opioides impediría la unión de la beta-endorfina liberada por el consumo crónico de etanol (Eskelson y cols., 1980; Schulz y cols., 1980; Patel y Pohorecky, 1989; de Waele y Gianoulakis, 1994) a sus receptores incrementando los niveles de expresión génica del péptido por un mecanismo compensatorio. Como consecuencia del bloqueo, disminuirían parte de los efectos reforzantes, neuroendocrinos y comportamentales inducidos por el etanol y se podrá facilitar el cese de su consumo al reducirse los efectos aversivos asociados a la falta de etanol en el organismo.

Algunos autores han demostrado que la ingesta crónica de etanol aumenta la liberación de Met-enkefalina en el núcleo accumbens y la hipófisis (Nylander y cols., 1994) y disminuye la expresión génica de proencefalina en el núcleo caudado-putamen y el núcleo accumbens (Cowen y cols., 1998; Cowen y Lawrence, 2001). Por lo que respecta a la expresión génica de proencefalina en nuestro trabajo, el tratamiento con naltrexona tendió a normalizar las reducciones en los niveles de ARNm de proencefalina ocasionados por el consumo crónico de etanol en los núcleos relacionados con el circuito del refuerzo. El bloqueo de los receptores  $\mu$  opioides y en menor medida los receptores  $\delta$  opioides ocasionado por la naltrexona impediría la unión de las encefalinas a sus receptores regulando al alza su biosíntesis en los núcleos relacionados con el refuerzo. Esto supone la normalización de los niveles de expresión génica de proencefalina y por tanto la reducción de los efectos reforzantes del etanol. Además, es también posible que

el escaso bloqueo de los receptores  $\kappa$  por el fármaco pueda disminuir ligeramente la aversión provocada por el consumo de la droga potenciándose la reducción del consumo como se ha podido constatar en otros estudios (Hyytiä y Kiianma, 2001; Lindholm y cols., 2001). Un resultado distinto es el encontrado en el núcleo paraventricular. La administración de naltrexona en nuestro modelo no bloqueó los efectos del etanol sobre la expresión génica de encefalina pero sí lo hizo en relación a la expresión génica del factor liberador de corticotropina. El núcleo paraventricular es un núcleo íntimamente relacionado con la respuesta a estímulos estresantes cuya actividad se modifica por el etanol. Los resultados obtenidos sugieren que tanto la expresión génica de proencefalina como la del factor liberador de corticotropina presentan una regulación y respuesta distintas al tratamiento con naltrexona. La razón de estas diferencias puede radicar en el papel de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  en la regulación de la expresión génica en el núcleo puesto que ambos tipos de receptores se encuentran en este núcleo. Es posible que la normalización de la expresión génica del factor liberador de corticotropina se encuentre más relacionada con el bloqueo preferente de los receptores  $\mu$  a las dosis utilizadas que impidan la unión de beta-endorfina mientras que el menor bloqueo de los receptores  $\delta$  posiblemente influiría en la falta de bloqueo de los efectos del etanol sobre la expresión génica de proencefalina en el núcleo paraventricular.

En los últimos años se ha venido investigando la relación entre el sistema cannabinoide y el consumo de etanol. De hecho, el sistema cannabinoide está implicado en la preferencia al consumo de etanol (Wang y cols., 2003; Hungund y cols., 2003; Poncelet y cols., 2003), y en la reducción del consumo voluntario por la administración del antagonista cannabinoide SR-141716 A (Arnone y cols., 1997; Freedland y cols., 2001; Colombo y cols., 1998; Ortiz y Manzanares, 2003; Rodríguez de Fonseca y cols., 1999).

Como se puede observar en los resultados, el consumo crónico de etanol modificó la expresión génica del receptor  $CB_1$  incrementándola en el núcleo caudado-putamen, ventromedial del hipotálamo, giro dentado y capa CA1 hipocampal. Tras la administración de naltrexona durante el consumo crónico de etanol, la expresión génica del receptor se

modificó drásticamente disminuyendo los niveles encontrados por la ingesta de etanol hasta la normalidad. Estos resultados sugieren la posible regulación del sistema opioide endógeno sobre la actividad del sistema cannabinoide como también han demostrado otros autores (Oliva y cols., 2003; Manzanares y cols., 1999; Corchero y cols., 1997a; Corchero y cols., 1997b).

Esto sugiere que el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> podría desempeñar un papel importante en los mecanismos neuroquímicos implicados en el consumo de etanol y el posible desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de la dependencia alcohólica.

Existe una amplia relación de estudios que documentan las interacciones entre el etanol y el sistema serotoninérgico (Verbanck y cols., 1990; Yoshimoto y cols., 1992a, b; Lovinger y cols., 1991). Los fármacos serotoninérgicos más ampliamente utilizados son los inhibidores de la recaptación de serotonina que reducen el consumo de etanol en animales y humanos (McBride y cols., 1988; Fadda y cols., 1991; Gill y cols., 1985; Naranjo y cols., 1984, 1989; 1990; Kranzler y cols., 1993). Sin embargo, en la práctica clínica el uso de este tipo de fármacos se ha centrado en el tratamiento del alcoholismo con algún trastorno psiquiátrico asociado (Kranzler y cols., 1995).

El consumo crónico de etanol aumenta la expresión génica del transportador de serotonina en los núcleos dorsal y medio del rafe en nuestro modelo y el tratamiento con naltrexona reduce los niveles de ARNm de forma significativa lo que implica al sistema opioide endógeno en la regulación del sistema serotoninérgico. El aumento de expresión génica del transportador podría deberse a una posible disminución de la liberación de serotonina en la ventana sináptica inducida por un proceso de neuroadaptación del sistema serotoninérgico tras el consumo crónico de etanol. Este resultado permite sugerir que el empleo de inhibidores de la recaptación de serotonina, no solo asociado a trastornos psiquiátricos, podría constituir una herramienta terapéutica útil en la reducción del consumo de etanol. Además, puesto que la naltrexona consigue revertir en parte los efectos ocasionados por el consumo crónico de etanol, la combinación de



ambos fármacos podría utilizarse como tratamiento farmacológico en la reducción de la ingesta crónica de etanol.

En definitiva, los resultados presentados en esta tesis avalan la participación del sistema opioide endógeno y del sistema dopaminérgico en la dependencia alcohólica. La alteración de la expresión génica de los péptidos opioides, las alteraciones en la funcionalidad del receptor  $\mu$  y las variaciones de la expresión génica de la tirosina hidroxilasa sugieren su participación en la inducción y mantenimiento de la ingesta de etanol. Además, participan de manera activa en la vulnerabilidad al consumo de etanol y en la sintomatología ocasionada por el cese del consumo del etanol.

La utilización de naltrexona como fármaco de elección en el cese del consumo y la prevención de recaídas está justificada tanto por los datos conductuales como por la reversión de los efectos neuroquímicos ocasionados tanto por el consumo de etanol como por el cese brusco de su ingesta

Por último, la alteración de otros sistemas de neurotransmisión (cannabinoide y serotoninérgico) por el consumo de etanol permite sugerir la posibilidad de comenzar a estudiar estrategias en el desarrollo de nuevas terapias que ayuden al cese de consumo de etanol.

## *Conclusiones*

1. Los resultados obtenidos tras la administración intra-gástrica aguda de etanol sugieren que los marcados cambios producidos en la expresión de genes de péptidos opioides y tirosina hidroxilasa en las horas siguientes a su ingestión están significativamente implicados en la respuestas a corto plazo del etanol y en los mecanismos que pudieran contribuir al inicio de los procesos relacionados con el desarrollo de dependencia.
2. La duración y el tipo de patrón de consumo (forzado, preferencia o no preferencia) afectan de manera diferente a la expresión de tirosina hidroxilasa, proencefalina, prodinorfina, proopiomelanocortina y receptor  $\mu$ -opioide. Los resultados sugieren que las diferencias más significativas encontradas entre ratas preferentes y no preferentes de la misma raza se encuentran en la expresión génica de tirosina hidroxilasa en el área del

tegmento ventral y en la expresión de prodinorfina en áreas del mesencéfalo, siendo por tanto estos genes y en las regiones estudiadas los más relacionados con el deseo de consumo de etanol.

3. La reducción en la función del sistema opioide endógeno (proencefalina, proopiomelanocortina, receptor  $\mu$ ) en áreas cerebrales implicadas en la regulación del refuerzo por el consumo de drogas adictivas en la raza de ratas Fawn Hooded (preferentes por el consumo de etanol) con respecto a la raza de ratas Wistar sugiere que esta disminución basal opiodérgica se podría asociar con una mayor vulnerabilidad genética por el consumo de etanol.

4. Las alteraciones observadas durante la retirada del consumo de etanol sugieren que gran parte de la sintomatología de la abstinencia podría estar ocasionada por una marcada reducción en la expresión de tirosina hidroxilasa en el área del tegmento ventral y en la función del receptor  $\mu$ -opioide en las regiones del mesencéfalo estudiadas. Estas alteraciones neuroquímicas podrían facilitar, al menos en parte, las recaídas observadas en los animales dependientes.

5. La administración de naltrexona produce una significativa reducción (50%) de la ingesta de etanol en ratas Wistar seleccionadas por su preferencia por el consumo de etanol, lo que sugiere que este fármaco, a las dosis y pauta indicadas, es claramente útil en el tratamiento de la deshabitación alcohólica en abstinencia y en programas de bebida controlada.

6. La reducción en la ingesta de etanol en ratas Wistar seleccionadas por su preferencia por el consumo de etanol se acompaña de una normalización en la expresión génica de proencefalina, receptor  $\mu$ -opioide, receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y transportador de serotonina lo que sugiere la participación de todos estos elementos en el desarrollo de la dependencia por el consumo de etanol. Además, algunos de estos resultados sugieren la posible utilidad de antagonistas del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y de los inhibidores de la recaptación de serotonina como dianas terapéuticas sinérgicas o alternativas en el tratamiento de la deshabitación alcohólica.

*"La calidad nunca es un accidente,  
siempre es el resultado de un esfuerzo de la inteligencia."*

**JOHN RUSKIN**

## ***Bibliografía***

Aguirre JC., Del Arbol JL., Raya J., Ruiz-Requena ME. y Rico Irles J. (1990) Plasma  $\beta$ -endorphin levels in chronic alcoholics. *Alcohol*, 2: 409-412.

Akil H., Watson SJ., Young E., Lewis ME., Khachaturian H. y Walker MJ. (1984). Endogenous opioids: Biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 223-255.

Aldrich MS., Brower KJ. y Hall JM. (1999). Sleep-disordered breathing in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23(1): 134-140.

Aldrich MS., Shipley JE., Tandon R., Kroll PD. y Brower KJ. (1993). Sleep-disordered breathing in alcoholics: association with age. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 17(6): 1179-1183.

- Alguacil LF. (1996). Aspectos farmacológicos del alcoholismo. En: Avances en Toxicomanías y alcoholismo. Valbuena A, Alamo C, eds. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, pp: 3]-37, ]1996.
- Allan AM. y Harris RA. (1987). Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 27(4): 665-670.
- Allan AM. y Harris RA. (1989) A new alcohol antagonist: phaclofen. *Life Sci.*, 45: 1771-1779.
- Altshuler HL., Phillips PE. y Feinhandler DA. (1980). Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. *Life Sci.*, 26: 679-688.
- Anton RF., Moak DH., Waid R., Latham PK., Malcolm RJ. y Dias JK. (1999). Naltrexone and cognitive behavioral therapy for the treatment of outpatient alcoholics. Results of a placebo-controlled trial. *Am. J. Psychiat.*, 156: 1758-1764.
- Anwer J. y Soliman MR. (1995) Ethanol-induced alterations in beta-endorphin levels in specific rat brain regions: Modulation by adenosine agonist and antagonist. *Pharmacology*, 51: 364-369.
- Arnone M., Maruani J., Chaperon F., Thiebot MH., Poncelet M. Soubrie, P. y Le Fur, G. (1997). Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB<sub>1</sub>) receptors. *Psychopharmacology*, 132: 104-106.
- Avoli M., Hwa G., Louvel J., Kurcewicz I., Pumain R. y Lacaille JC. (1997). Functional and pharmacological properties of GABA-mediated inhibition in the human neocortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75(5): 526-534.
- Backstrom P., Bachteler D., Koch S., Hyytia P. y Spanagel R. (2004). mGluR5 antagonist MPEP reduces ethanol-seeking and relapse behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29(5): 921-928.

Bailey CP., Molleman A. y Little HJ. (1998). Comparison of the effects of drugs on hyperexcitability induced in hippocampal slices by withdrawal from chronic ethanol consumption Br. J. Pharmacol., 123(2): 215-222.

Baldessarini RJ y Tarazi FI. (1996). Brain dopamine receptors: A primer on their current status, basic and clinical. Harvard Rev. Psychiat., 3: 301-325.

Balldin J., Berggren U., Bokstrom K., Eriksson M., Gottfries CG., Karlsson I. y Walinder J. (1994). Six-month open trial with Zimelidine in alcohol-dependent patients: reduction in days of alcohol intake. Drug Alcohol Depend., 35(3): 245-248.

Ballenger JC., Goodwin FK., Major LF. y Brown GL. (1979). Alcohol and central serotonin metabolism in man Arch. Gen. Psychiatry, 36(2): 224-227.

Beattie CE. y Siegel RE. (1993). Developmental cues modulate GABAA receptor subunit mRNA expression in cultured cerebellar granule neurons. J. Neurosci., 13(4): 1784-1792.

Beck O., Borg S., Holmstedt B., Kvande H. y Shroder R. (1980). Concentration of serotonin metabolites in the cerebrospinal fluid from alcoholics before and during disulfiram therapy. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh);47(4):305-307.

Becker U. (1993). The influence of ethanol and liver disease on sex hormones and hepatic oestrogen receptors in women. Dan. Med. Bull., 40(4): 447-459.

Beilin LJ. (1995). Alcohol and hypertension. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 22(3): 185-188.

Benjamin D., Grant ER. y Pohorecky LA. (1993). Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. Brain Res., 621: 137-140.

Besancon F. (1993). Time to alcohol dependence after abstinence and first drink. Addiction, 88: 1647-1650.

Besson J., Aeby F., Kasas A., Lehert P y Potgieter A. (1998). Combined efficacy of acamprosato and disulfiram in the treatment of alcoholism. A controlled study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22: 573-579.

Blackburn, J. R., Phillips, A. G. y Fibiger, H. C. (1987). Dopamine and preparating behavior: I. Effects of pimozide. *Behav. Neurosci.*, 101: 352-360.

Blum K., Wallace JE. y Friedman RN. (1974). Reduction of acute alcoholic intoxication by alpha amino acids: glycine and serine. *Life Sci.*, 14(3): 557-565.

Bonthenent ML., Souil E, Martres M-P, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: Comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.*, 564(2): 203-219.

Bowers BJ., Collins AC. y Wehner JM. (2000). Background genotype modulates the effects of g-PKC on the development of rapid tolerance to ethanol-induced hypothermia. *Addiction Biol.*, 5:47-58.

Bowers BJ., Mihalek RM., Homanics GE. y Wehner JM. (2000b). Decreased ethanol consumption in GABAA delta subunit knockout mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 24: 97A, 2000b.

Bowers BJ., Owen EH., Collins AC., Abeliovich A., Tonegawa S. y Wehner JM. (1999). Decreased ethanol sensitivity and tolerance development in gamma-PKC null mutant mice is dependent on genetic background. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23: 387-397.

Boyadjieva NI. y Sarkar DK. (1994). Effects of chronic alcohol on immunoreactive beta-endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures: evidence for alcohol tolerance, withdrawal, and sensitization responses. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18(6): 1497-501.



Bozarth MA. y Wise RA. (1984). Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, 224: 516-517.

Brewer C. (1986). Patterns of compliance and evasión in treatment programes which includes supervised disulfiram. *Alcohol Alcohol.*, 21: 385-388.

Brien JF. y Smith GN. (1991). Effects of alcohol (ethanol) on the fetus. *J. Dev. Physiol.*, 15(1): 21-32.

Brodie MS. y Appel SB. (1998). The effects of ethanol on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area studied with intracellular recording in brain slices. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 236-244.

Brodie MS., Pesold C. y Appel SB. (1999). Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23: 1848-1852.

Brodie MS., Shefner SA. y Dunwiddie TV. (1990). Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res.* 508: 65-69.

Broitman SA., Gottlieb LS. y Vitale JJ. (1976). Augmentation of ethanol absorption by mono- and disaccharides. *Gastroenterology*, 70: 1101-1107.

Brower KJ. (2001). Alcohol's effects on sleep in alcoholics. *Alcohol Res. Health*, 25(2): 110-125.

Brunetti G., Carai MA., Lobina C., Melis S., Serra S., Vacca G., Gessa GL. y Colombo G. (2002). Differences in ethanol-induced conditioned taste aversion in Sardinian alcohol-preferring and Sardinian alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol*, 26(3): 167-172.

Buck KJ. (1996). Molecular genetic analysis of the role of GABAergic systems in the behavioral and cellular actions of alcohol. *Behav. Genetics*, 26: 313-323.

Buck KJ. y Harris RA. (1990). Benzodiazepine agonist and inverse agonist actions on GABAA receptor-operated chloride channels. II. Chronic effects of ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253(2): 713-719.

Buck KJ., McQuilkin SJ. y Harris RA. (1991). Modulation of gamma-aminobutyric acidA receptor-operated chloride channels by benzodiazepine inverse agonists is related to genetic differences in ethanol withdrawal seizure severity. *J. Neurochem.*, 57(6): 2100-2105.

Budygin EA., Phillips PE., Whightman RM. y Jones SR (2001). Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. *Synapse*, 42: 77-79.

Bunzow JR., Van Tol HH., Grandy DK., Albert P., Salon J., Chisre M., Machida CA., Neve KA. y Civelli O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336(6201): 783-787.

Burish TG., Maistro SA., Cooper AM. y Sobell MB. (1981). Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. *J. Stud. Alcohol* 42: 1013-1017.

Camí J. y Ayesta FJ. (1997). Farmacodependencias. En: *Farmacología Humana* (Flórez J, dir.). Masson S.A., Barcelona, pp: 575-579, 1997.

Campbell AD., Kohl RR. y McBride WJ. (1996). Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release. *Alcohol*, 13: 569-574.

Carlen P., Rougier-Naquet I. y Reynolds JN. (1990). Alterations of neuronal calcium and potassium currents during alcohol administration and withdrawal. In: *Alcohol and Seizures*, pp. 68±78. Eds. RJ Porter, RH Mattson, JA Cramer, I Diamond and DG Schoenberg. FA Davis, Philadelphia, PA.

Carlsson A. (1993). Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurology*, 60: 1-17

Carr JA., Saland LC., Samora A., Desai S. y Benevidez S. (1990). Stress-induced peptide release from rat intermediate pituitary. An ultrastructural analysis. *Cell Tissue Res.*, 261: 589-593.

Carter LA., Belknap JK., Crabbe JC. y Janowsky A. (1995). Allosteric regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor-linked ion channel complex and effects of ethanol in ethanol-withdrawal seizure-prone and -resistant mice. *J. Neurochem.*, 64(1): 213-219.

Carvalho CM., Santos SV. y Carvalho AP. (1986). gamma-Aminobutyric acid release from synaptosomes as influenced by Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Eur. J. Pharmacol.*, 131(1): 1-12.

Casariello CP. (1990). Utilidad de la carbamazepina en el tratamiento ambulatorio del síndrome de abstinencia alcohólico leve y moderado. *Revista Española de Drogodependencias*, 15: 123-126.

Casu MA., Colombo G., Gessa GL. y Pani L. (2002). Reduced TH-immunoreactive fibers in the limbic system of Sardinian alcohol-preferring rats. *Brain Res.*, 924(2): 242-251.

Cernovsky ZZ. (1985). MMPI and nightmares in male alcoholics. *Percept Mot. Skills*, 61(3 Pt 1): 841-842.

Chari S., Teyssen S. y Singer MV. (1993). Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut*, 34(6): 843-847.

Charnes, ME. (1989). Ethanol and opioid receptor signalling. *Experientia*, 45: 518-528.

Charness ME., Gordon AS. y Diamond I. (1983). Ethanol modulation of opiate receptors in cultured neural cells. *Science*, 222: 1246-1248.

Chen F., Rezvani A., Jarrott B. y Lawrence AJ. (1998). Distribution of GABAA receptors in the limbic system of alcohol-preferring and non-preferring rats: In situ hybridisation histochemistry and receptor autoradiography. *Neurochem. Int.*, 32: 143–151.

Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley JA. y Yu L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 44: 8–12.

Chester JA., Lumeng L., Li TK. y Grahame NJ. (2003). High-and low-alcohol-preferring mice show differences in conditioned taste aversion to alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 27(1): 12–18.

Chiamulera C., Valerio E. y Tessari M. (1995). Resumption of ethanol-seeking behavior in rats. *Behavioral Pharmacol.*, 6: 32–39.

Chio C., Drong R., Riley D., Gill G., Slightom J. y Huff R. (1994). D4 dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 269: 11813–11819.

Chiodo, I., Freeman, A. y Bunney B. (1995). Dopamine autoreceptor signal transduction and regulation. In: Bloom F, Kupfer D, Eds. *Psychopharmacology: Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York, pp. 221–226.

Civelli O., Douglass J., Goldstein A. y Herbert E. (1985). Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4291–4295.

Cohn TJ., Foster JH. y Peters TJ. (2003). Sequential studies of sleep disturbance and quality of life in abstaining alcoholics. *Addict. Biol.*, 8(4): 455–462.

Cole, JC., Littleton, JM. y Little, HJ. (2000). Acamprosate, but not naltrexone, inhibits conditioned abstinence behaviour associated with repeated ethanol administration and exposure to plus-maze. *Psychopharmacology*, 147: 403–411.

Collins GB., Brosnihan KB., Zuti RA., Messina M. y Gupta MK. (1992). Neuroendocrine, fluid balance, and thirst responses to alcohol in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16(2): 228-233.

Colombo G. (1997). ESBRA-Nordmann 1996 Award Lecture: Ethanol drinking behavior in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol.* 32 :443-453.

Colombo G., Agabio R., Fa M., Guano L., Lobina C., Loche A., Reali R. y Gessa GL. (1998). Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol Alcohol.*, 33: 126-130.

Cook CHC., Halwood PM. y Thomson AD. (1998). B Vitamin deficiency and neuropsychiatric syndromes in alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.*, 33: 317-336.

Cooper J., Bloom F. y Roth R. (1991). Dopamine. In: Cooper, Bloom, Roth, Eds, *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Oxford University Press, New York, pp. 285-337.

Corchero J., Avila MA., Fuentes JA. y Manzanares J. (1997a). delta-9-Tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci.*, 61(4): PL 39-43.

Corchero J., Fuentes JA. y Manzanares J. (1997b). delta 9-Tetrahydrocannabinol increases proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, 323(2-3): 193-195.

Cornelius JR., Bukstein OG., Birmaher B., Salloum IM., Lynch K., Pollock NK., Gershon S. y Clark D. (2001). Fluoxetine in adolescents with major depression and an alcohol use disorder: an open-label trial. *Addict. Behav.*, 26(5): 735-739.

Cornelius JR., Salloum IM., Ehler JG., Jarrett PJ., Cornelius MD., Perel JM., Thase ME. y Black A. (1997). Fluoxetine in depressed alcoholics. A double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiatry*, 54(8): 700-705.

Cornelius JR., Salloum IM., Haskett RF., Daley DC., Cornelius MD., Thase ME. y Perel JM. (2000). Fluoxetine versus placebo in depressed alcoholics: a 1-year follow-up study *Addict. Behav.*, 25(2): 307-310.

Cowen MS. y Lawrence AJ. (1999). The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23: 1171-1212.

Cowen MS. y Lawrence AJ. (2001). Alterations in central preproenkephalin mRNA expression after chronic free-choice ethanol consumption by fawn-hooded rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 25(8): 1126-1133.

Cowen MS., Jarrott B. y Lawrence AJ. (1999a). Regulation of  $\delta$  opioid receptors and preproenkephalin mRNA in the Fawn-Hooded rat by alcohol and naltrexone. *Proc. Aust. Neurosci. Soc.*, 10: 08-5.

Cowen MS., Rezvani A., Jarrott B. y Lawrence AJ. (1998). Distribution of opioid peptide gene expression in the limbic system of Fawn-Hooded (alcohol-preferring) and Wistar-Kyoto (alcohol-non-preferring) rats. *Brain Res.*, 796(1-2): 323-326.

Cowen MS., Rezvani AH., Jarrott B. y Lawrence AJ. (1999). Ethanol consumption by Fawn-Hooded rats following abstinence: Effect of naltrexone and changes in  $\mu$ -opioid receptor density. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1008-1014.

Crabbe JC., Merrill CM., Kim D. y Belknap JK. (1990). Alcohol dependence and withdrawal: a genetic animal model. *Ann. Med.*, 22(4): 259-263.

Crabbe JC., Phillips TJ., Feller DJ., Hen R., Wenger CD., Lessov CN. y Schafer, GL. (1996). Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors. *Nature Genetics* 14: 98–101.

Crabbe, JC., Jr., Allen, RG., Gaudette, ND., Young, ER., Kosobud, A. y Stack, J. (1981) Strain differences in pituitary  $\beta$ -endorphin and ACTH content in inbred mice. *Brain Res.*, 219: 219–223.

Crabbe, JC., Keith, LD., Kosobud, A. y Stack, J.(1983). Ethanol dependence and the pituitary–adrenal axis in mice. I. Genotypic differences in hormone levels. *Life Sci.*, 33:1877–1887.

Cragg B. y Phillips S. (1984). A search for brain damage in a rat model of alcoholic sleep apnea. *Exp. Neurol.*, 84(1): 219–224.

Crews FT., Morrow AL., Criswell H. y Breese, G. (1996). Effects of alcohol on ion channels. *Int. Rev. Neurobiol.*, 39: 283–367.

Criswell HE., McCown TJ. y Breese GR. (1995). Effect of zolpidem on a subset of neurons in the SNR: relation to ethanol sensitivity and cell morphology. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21: 354.

Criswell HE., Simson PE., Duncan GE., McCown TJ., Herbert JS., Morrow AL. y Breese GR. (1993). Molecular basis for regionally specific action of ethanol on gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: generalization to other ligand-gated ion channels. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 267: 522–537.

Crowe LC. y George WH. (1989). Alcohol and human sexuality: review and integration. *Psychol. Bull.*, 105(3): 374–386.

Cunningham CL., Hallett CL., Niehus DR., Hunter JS., Nouth L. y Risinger FO. (1991). Assessment of ethanol's hedonic effects in mice selectively bred for sensitivity to ethanol-induced hypothermia. *Psychopharmacology*, 105: 84-92.

Cunningham CL., Henderson CM., Bormann NM. (1998). Extinction of ethanol-induced conditioned place preference and conditioned place aversion: Effects of naloxone. *Psychopharmacology*, 139: 62-70.

Cunningham CL., Howard MA., Gill SJ., Rubinstein M., Low MI. y Grandy DK. (2000). Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67: 693-699.

Cunningham CL., Niehus DR., Malott DH. y Prather LK. (1992). Genetic differences in the rewarding and activating effects of morphine and ethanol. *Psychopharmacology*, 107:385-393.

Cunningham CL., Niehus JS. y Noble D. (1993). Species difference in sensitivity to ethanol's hedonic effects. *Alcohol*, 10: 97-102.

Curran EJ. y Watson SJ Jr. (1995). Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: A double in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 361: 57-76.

Curtis DR. (1995). GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci.*, 18: 263.

Dählström A. y Fuxe K. (1964). Evidence of the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl 232). 1-55.

Dave JR., Eiden LE., Karanian JW. y Eskay RL. (1986). Ethanol exposure decreases pituitary corticotropin-releasing factor binding, adenylate cyclase activity, proopiomelanocortin biosynthesis and plasma  $\beta$ -endorphin levels in the rat. *Endocrinology*, 118: 280-286.



Davidoff RA. (1981). Amino acids and presynaptic inhibition. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*; 29: 249-255.

de Gortari P., Mendez M., Rodriguez-Keller I., Perez-Martinez L. y Joseph-Bravob P. (2000). Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem. Int.*, 37(5-6): 483-496.

de Waele JP. y Gianoulakis C. (1993). Effects of single and repeated exposures to ethanol on hypothalamic  $\beta$ -endorphin and CRH release by the C57BL/6 and DBA/2 strains of mice. *Neuroendocrinology*, 3: 700-709.

de Waele JP. y Gianoulakis C. (1994). Enhanced activity of the brain  $\beta$ -endorphin system by free-choice ethanol drinking in C57BL/6 but not DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 258: 119-129.

de Waele JP. y Gianoulakis C. (1997). Characterization of the  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in the brain of the C57BL/6 and DBA/2 mice selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.*; 21: 754-762.

de Waele JP., Kiianmaa K. y Gianoulakis C. (1994). Spontaneous and ethanol-stimulated in vitro release of  $\beta$ -endorphin by the hypothalamus of AA and ANA rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18: 1468-1473.

de Waele JP., Kiianmaa K. y Gianoulakis C. (1995). Distribution of the  $\mu$  and  $\delta$  opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275: 518-527.

de Waele JP., Papachristou DN. y Gianoulakis C. (1992). The alcohol-preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hypothalamic  $\beta$ -endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding DBA/2 mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261: 788-794.

Dearry A., Gingrich J., Falardeau P., Fremeau R., Bates M. y Caron MG. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, 347(6288): 72-76.

Deltour, L., Foglio MH, y Duester G. (1999). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 274(24): 16796-16801.

Deneau GA., Yanagita T. y Seevers MH. (1969). Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia*, 16: 30-48.

Deutch AY. y Cameron DS. (1992). Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, 46(1): 49-56.

Deutsch JA. y Eisner A. (1977). Ethanol self-administration in the rat induced by forced drinking of ethanol. *Behav. Biol.*, 20(1): 81-90.

Devaud LL., Purdy RH., Finn DA. y Morrow AL. (1996). Sensitization of  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors to neuroactive steroids in rats during alcohol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278: 510-517.

Di Chiara G. (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol. Dep.*, 38: 95-137.

Di Chiara G. e Imperato A. (1988a). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic systems of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5274-5278.

Di Chiara, G. e Imperato, A. (1988b). Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in nucleus accumbens and the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244: 1067-1080.

Diana M., Gessa G. y Rossetti Z. (1992). Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system. *Alcohol Alcohol.*, 27: 329–333.

Diana M., Pistis M., Carboni S., Gessa GL. y Rossetti ZL. (1992). Profound decrement of mesolimbic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 7966–7969.

Diana M., Pistis M., Muntoni A. y Gessa G. (1996). Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence. *Neuroscience*, 71(2): 411–415.

Dilts RP. y Kalivas PW. (1989). Autoradiographic localization of mu-opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Res.*, 488:311–327.

Dilts RP. y Kalivas PW. (1990). Autoradiographic localization of delta opioid receptors within the mesocorticolimbic dopamine system using radioiodinated [2-D-penicillamine, 5-D-penicillamine]enkephalin (<sup>125</sup>I-DPDPE). *Synapse*, 6: 121–132.

Djouma E. y Lawrence AJ. (2002). The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302: 551–559.

Eipper BA. y Mains RE. (1980). Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* 1: 1–27.

El-Ghundi M., George SR., Drago J., Fletcher PJ., Fan T., Nguyen T., Liu C., Sibley DR., Westphal H. y O'Dowd BF (1998) Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *Eur. J. Pharmacol.*, 353: 149–158.

Emerson RB. y Eipper BA. (1986). Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus. *J. Neurosci.*, 6: 837–849.

Engberg G. y Hajos M. (1992). Alcohol withdrawal reaction as a result of adaptive changes of excitatory amino acid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 346(4): 437-441.

Engel SR. y Allan AM. (1999). 5-HT<sub>3</sub> receptor over-expression enhances ethanol sensitivity in mice. *Psychopharmacology.*, 144: 411-415.

Engel SR., Lyons CR. y Allan AM. (1998). 5-HT<sub>3</sub> receptor over-expression decreases ethanol self-administration in transgenic mice. *Psychopharmacology*, 140: 243-248.

Enjalbert A., Sladeczek F., Guillon G., Bertrand P., Shu C, Epelbaum J., García Sainz A., Jard S., Lombard C., Kordon C., et al. (1986). Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 261(9): 4071-4075.

Eriksson K. (1968). Genetic selection for voluntary alcohol consumption in the albino rat. *Science*, 159: 739-741.

Eskay RL., Chautard T., Torda T., Daoud RI. y Hamelink C. (1995). Alcohol, corticosteroids, energy utilization, and hippocampal endangerment. *Annals New York Acad. Sciences*, 771: 105-114.

Eskelson CD., Hameroff SR. y Kanel JS. (1980). Ethanol increases serum  $\beta$ -endorphin levels in rats. *Anesth. Analg.*, 3: 537-538.

Evans CJ., Keith DE Jr., Morrison H., Magendzo K. y Edwards RH. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258: 1952-1955.

Fadda F., Garau B., Marchei F., Colombo G. y Gessa GL. (1991). MDL 72222, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol.*, 26(2): 107-110.

Fadda F., Mosca E., Colombo G. y Gessa GL. (1989). Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism. *Life Sci.*, 44(4): 281-287.

Fadda F., Mosca E., Colombo G. y Gessa GL. (1990). Alcohol-preferring rats: genetic sensitivity to alcohol-induced stimulation of dopamine metabolism. *Physiol. Behav.*, 47(4): 727-729.

Fadda, F., Tronci, S., Colombo, G. y Fratta, W. (1999). Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-non preferring rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1296-1305.

Fallon JH. y Moore RY. (1978a). Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J. Comp. Neurol.*, 180(3): 533-544. Fallon JH. y Moore RY. (1978b). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.*, 180(3): 545-580.

Fallon JH., Koziell DA. y Moore RY. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.*, 180(3): 509-532.

Feinman L. y Lieber CS. (1992). Nutrition: medical problems of alcoholism. En Sieber CS. *Medical and nutritional complications of alcoholism. Mechanisms and management.* Plenum Medical, Nueva York, pp518-526.

File SE., Baldwin HA. y Hitchcott PK. (1989). Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology*, 98(2): 262-264.

File SE., Zharkovsky A. y Hitchcott PK. (1992). Effects of nitrendipine, chlordiazepoxide, flumazenil and baclofen on the increased anxiety resulting from alcohol withdrawal.

Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiat., 16(1): 87-93. Florijn WJ., Tarazi FI. y Creese I. (1997). Dopamine Receptors. In: Bittar EE, Bittar N, Eds, Principles of Medical Biology, JAI Press, New York, pp. 73-94.

Freedland CS., Sharpe AL., Samson HH. y Porrino LJ. (2001). Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. Alcohol. Clin. Exp. Res., 25: 277-282.

Freund RK., Van Horne CG., Harlan T. y Palmer MR. (1993). Electrophysiological interactions of ethanol with GABAergic mechanisms in the rat cerebellum in vivo. Alcohol Clin. Exp. Res., 17: 321-328.

Friedman HS. (1998). Cardiovascular effects of alcohol. Recent Dev. Alcohol., 14:135-166.

Froehlich JC. (1997). Opioid peptides. Alcohol Health Res. World, 21: 132-136.

Froehlich JC., Harts J., Lumeng L. y Li TK (1987). Naloxone attenuation of voluntary alcohol consumption. Alcohol Alcohol. Suppl., 1: 333-337.

Froehlich JC., Harts J., Lumeng L. y Li TK. (1988). Differences in response to the aversive properties of ethanol in rats selectively bred for oral ethanol preference. Pharmacol. Biochem. Behav., 31(1): 215-222.

Froehlich JC., Harts J., Lumeng L. y Li TK. (1990). Naloxone attenuates voluntary ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference. Pharmacol. Biochem. Behav., 35: 385-390.

Froehlich, JC., Zweifel, M., Harts, J., Lumeng, L. y Li, TK. (1991). Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking. Psychopharmacology, 103: 467-472.

Frye GD. y Fincher A. (1996). Sensitivity of postsynaptic GABAB receptors on hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons to ethanol. Brain Res., 735: 239-248.

Frye GD., McCown TJ. y Breese GR. (1983). Characterization of susceptibility to audiogenic seizures in ethanol dependent rats after microinjection of GABA agonists into the inferior colliculus, substantia nigra or medial septum. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 227: 663-667.

Frye GD., Taylor L., Trzeciakowski JP. y Griffith WH. (1991). Effects of acute and chronic ethanol treatment on pre and postsynaptic responses to baclofen in rat hippocampus. *Brain Res.*, 560: 84-91.

Fujii W., Hori H., Yokoo Y., Suwa Y., Nukaya H. y Taniyama K. (2002). Beer congener stimulates gastrointestinal motility via the muscarinic acetylcholine receptors. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 26(5): 677-681.

Fujimiya T, Fukui Y, Komura S. (1995). Pharmacokinetics of ethanol drinking--absorption kinetics and first-pass effect. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 1995 Apr;49(2):92-103.

Gann HJ., Faulmann A., Kiemen A., Klein T., Ebert D., Backhaus J., Hornyak M., Voderholzer U., Hohagen F., Berger M. y Riemann D. (1998). Sleep and the cholinergic rem sleep induction test in patients with primary alcoholism. *Sleep Res. Online*, 1(2): 92-95.

Gatto GJ., McBride WJ., Murphy JM., Lumeng L. y Li TK.(1994). Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol*, 11: 557-564.

Geijer, T., Jönsson, E., Neiman, J., Gyllander, A., Sedvall, G., Rydberg, U. y Terenius, L. (1997) Prodynorphin allelic distribution in Scandinavian chronic alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21: 1333-1336.

Gelernter J., Kennedy JL., van Tol HH, Civelli O, Kidd KK. (1992). The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics*, 13(1): 208-210.

George, SR., Roldan, L., Lui, A. y Naranjo, CA. (1991). Endogenous opioids are involved in the genetically determined high preference for ethanol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15: 668-672.

Gessa GL., Muntoni F., Collu M., Vargiu L. y Mereu G. (1995). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurones in the ventral tegmental area. *Brain Res.*, 348: 201-203.

Gianoulakis C, Hutchison WD. y Kalant H. (1988). Effects of ethanol treatment and withdrawal on the biosynthesis and processing of pro-opiomelanocortin by the rat neurointermediate lobe. *Endocrinology*, 122: 817-825.

Gianoulakis C. (1983). Long term ethanol alters the binding of <sup>3</sup>H-opiates to brain membranes. *Life Sci.*, 2: 125-133.

Gianoulakis C. (1996) Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. *Alcohol Alcohol.*, 31: 33-42.

Gianoulakis C. y Barcomb A. (1987). Effect of acute ethanol in vivo and in vitro on the  $\beta$ -endorphin system in the rat. *Life Sci.*, 40: 19-28.

Gianoulakis C. y de Waele JP. (1994). Genetics of alcoholism: role of the endogenous opioid system. *Metab. Brain Dis.*, 9(2): 105-131.

Gianoulakis C. y Gupta A. (1986a). Inbred strains of mice with variable sensitivity to ethanol exhibit differences in the content and processing of  $\beta$ -endorphin. *Life Sci.*, 3: 2315-2325.

Gianoulakis C. y Gupta A. (1986b). Neurointermediate lobe transplanted under the kidney capsule modifies the activity of the neuro-intermediate lobe in situ, but does not respond to opiate treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64: 430-437.



Gianoulakis C., Beliveau D., Angelogianni P., Meaney M., Thavundayil J., Tawar V. y Dumas M. (1989). Different pituitary  $\beta$ -endorphin and adrenal cortisol response to ethanol in individuals with high and low risk for future development of alcoholism. *Life Sci.*, 45: 1097-1109.

Gianoulakis C., de Waele JP. y Kiianmaa K. (1992). Differences in the brain and pituitary  $\beta$ -endorphin system between the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 16: 453-459.

Gianoulakis C., Krishnan B. y Thavundayil J. (1996) Enhanced sensitivity of pituitary  $\beta$ -endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 53: 250-257.

Giesler GJ Jr., Menetrey D. y Basbaum AT. (1979). Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 184: 107-126.

Gil E., Robledo T. y Rubio J. (1998). Medio ambiente y estilos de vida: tabaco y alcohol. *Jornadas de Cooperación Sanitaria*, Madrid.

Gill K., Amit Z. y Ogren SO. (1985). The effects of zimeldine on voluntary ethanol consumption: studies on the mechanism of action. *Alcohol*, 2(2): 343-347.

Gillan MG. y Kosterlitz HW. (1982). Spectrum of the mu, delta- and kappa-binding sites in homogenates of rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 77: 461-469.

Giros B., Martres MP., Piton C., Sokoloff P., Schwartz JC. (1991). Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 1584-1592.

Giros B., Sokoloff P., Martres MP., Riou IF., Emorine LI., Schwartz IC. (1990). Cloning of the human D3 dopaminergic receptor and chromosome identification. *C.R. Acad. Sci, Paris, Serie III*, Vol. 311, pp 501-508.

Goldman D. (1995). Candidate genes in alcoholism. *Clin. Neurosci.*, 3: 174–181.

Goldstein A. y Naidu A. (1989). Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Mol. Pharmacol.*, 36: 265–272.

Goldstein A., Tachibana S., Lowney LI., Hunkapiller M. y Hood L: (1979) Dynorphin (1–13), an extraordinary potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76(12): 6666–6670.

Gong JH., Li XW., Lai ZN., Froehlich JC. y Yu L. (1997). Quantitative comparison of mu opioid receptor mRNA in selected CNS regions of alcohol naive rats selectively bred for high and low alcohol drinking. *Neurosci. Lett.*, 227: 9–12.

Gonzales RA. y Hoffman PL. (1991). Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12: 1–3.

Gonzales RA. y Weiss F. (1998). Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, 18: 10663–10671.

Gorelick DA. y Paredes A. (1992). Effect of fluoxetine on alcohol consumption in male alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16(2): 261–265.

Gottlieb DI. (1988). GABAergic neurons. *Sci. Am.*; 258(2): 82–89.

Graham NJ., Low MJ. y Cunningham CL. (1998). Intravenous self-administration of ethanol in  $\beta$ -endorphin-deficient mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22: 1093–1098.

Gramsh C., Kleber G., Höllt V., Pasi A., Mehracin P. y Herz A. (1980). Pro-opiocortin fragments in human and rat brain: beta-endorphin and alpha-MSH are the predominant peptides. *Brain Res.*, 192(1): 109–119.

Grandy D., Zhong Y., Bouvier C., Zhou Q., Johnson R., Allen L, Buck K., Bunzow JR., Salon J. y Civelli O. (1991). Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(20): 9175-9179.

Grant KA., Valverius P., Hudspeth M. y Tabakoff B. (1990). Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.*, 176(3): 289-296.

Grisel JE., Mogil JS., Grahame NJ., Rubinstein M., Belknap JK. Crabbe JC. y Low MJ. (1999). Ethanol oral self-administration is increased in mutant mice with decreased beta-endorphin expression *Brain Res.*, 835(1): 62-67.

Grobin AC., Matthews DB., Devaud LL. y Morrow AL. (1998). The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology*. 139: 2-19.

Gulya K, Grant KA, Valverius P y cols., (1991). Brain regional specificity and time-course of changes of the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res.*, 547: 129-134.

Gulya K., Orpana AK., Sikela JM. y Hoffman, PL. (1993) Prodynorphin and vasopressin mRNA levels are differentially affected by chronic ethanol ingestion in the mouse. *Mol. Brain Res.*, 20: 1-8.

Hall FS, Sora L, Li X-F, Karmacharya N, Goodman N, Uhl GR. (1999). Decreased responses to ethanol mu-opiate receptor knockout mice [abstract 535.17]. *Society for Neuroscience abstracts of the 29th annual meeting; 1999 Oct 23-28; Miami Beach (FL). Washington (DC): Society for Neuroscience.* 25:1327.

Hall FS., Sora L., Uhl GR. (2001). Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology*, 154(1): 43-49.

Hamilton MG., Hirst M. y Blum K. (1979). Opiate-like activity of salsolinol on the electrically stimulated guinea pig ileum. *Life Sci.*, 25: 2205-2210.

Hammer JrRP., Bogic L. y Handa RJ. (1993). Estrogenic regulation of proenkephalin mRNA expression in the ventromedial hypothalamus of the adult male rat. *Mol. Brain Res.*, 19: 129-134.

Harlan RE., Shivers BD., Romano GJ., Howells RD. y Pfaff DW. (1987). Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 258: 159-184.

Harris RA., McQuilken SJ., Paylor R., Abeliovich A., Tonegawa S. y Wehner JM. (1995b). Mutant mice lacking the  $\gamma$ -isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3658- 3662.

Harris RA., Mihic SJ., Brozowski S., Hadingham K. y Whiting PJ. (1997). Ethanol, flunitrazepam, and pentobarbital modulation of GABAA receptors expressed in mammalian cells and *Xenopus* oocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21(3): 444-451

Harris RA., Proctor WR., McQuilkin SJ., Klein RL., Mascia MP., Whatley V., Whiting PJ. y Dunwiddie TV. (1995a). Ethanol increases GABAA responses in cells stably transfected with receptor subunits. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19(1): 226-232.

He L., Ronis MJ. y Badger TM. (2002). Ethanol induction of class I alcohol dehydrogenase expression in the rat occurs through alterations in CCAAT/enhancer binding proteins beta and gamma. *J. Biol. Chem.*, 277(46): 43572-43577.

He L., Simmen FA., Ronis MJ. y Badger TM. (2004). Post-transcriptional regulation of sterol regulatory element binding protein-1 by ethanol induces class I alcohol dehydrogenase in rat liver. *J. Biol. Chem.*, Apr 28

Heimer L., Zahm DS., Churchill L., Kalivas PW. y Wohltmann C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41(1): 89-125.

Heimer, L., Zham, D. S. y Alheid, G. F. (1995). Basal ganglia. In *The Rat Nervous System*, 2<sup>nd</sup> edn., pp. 579-614. Edited by Paxinos, G., Sydney, Academic Press.

Heinz A., Jones DW., Bissette G., Hommer D., Ragan P., Knable M., Wellek S., Linnoila M. y Weinberger DR. (2002). Relationship between cortisol and serotonin metabolites and transporters in alcoholism [correction of alcoholism] *Pharmacopsychiatry*, 35(4): 127-134.

Heinz A., Ragan P., Jones DW., Hommer D., Williams W., Knable MB., Gorey JG., Doty L., Geyer C., Lee KS., Coppola R., Weinberger DR. y Linnoila M. (1998). Reduced central serotonin transporters in alcoholism. *Am. J. Psychiatry*, 155(11): 1544-1549.

Heinz A., Schafer M., Higley JD., Krystal JH. y Goldman D. (2003). Neurobiological correlates of the disposition and maintenance of alcoholism. *Pharmacopsychiatry*, 36 (Suppl 3): S255-258

Hemery Y., Broustet H., Guiraudet O., Schiano P., Godreuil C., Plotton C. y Ollivier JP. (2000). Alcohol and rhythm disorders. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*, 49(8): 473-479.

Hemmings, H. y Greengard, P. (1986). DARPP-32, a dopamine and 3'-5' monophosphate-regulated phosphoprotein: regional, tissue and phylogenetic distribution. *J. Neurosci.*, 6: 1469-1481.

Hemmings, H., Walaas, B., Ouiment, C. y Greengard, P. (1987). Dopaminergic regulation of protein phosphorylation in the striatum: DARPP-32. *Trends Neurosci.* 10: 377-383.

Herbert V. y Tisman G. (1975). Hematologic effects of alcohol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 252: 307-315.

Herz A. (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129: 99-111.

Heyser CJ., Roberts AJ., Schulteis G. y Koob GF. (1999). Central administration of an opiate antagonist decreases oral ethanol self-administration in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1468–1476.

Hiemke C., Jussofie A. y Juptner M. (1991). Evidence that 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one is a physiologically relevant modulator of GABA-ergic neurotransmission. *Psychoneuroendocrinology*, 16(6): 517–523.

Hill RM., Hegemier S. y Tennyson LM. (1989). The fetal alcohol syndrome: a multihandicapped child. *Neurotoxicology*, 10(3): 585–595.

Hiller JM., Angel LM. y Simon EJ. (1981). Multiple opiate receptors: alcohol selectively inhibits binding to delta receptor. *Science*, 214: 468–469.

Hodge .W., Mehmert KK., Kelley SP., McMahon T., Haywood A., Olive MF., Wang D., Sanchez-Pérez AM. y Messing RO (1999). Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nature Neurosci.*, 2(11): 997–1002.

Hodge CW., Samson HH. y Chappelle AM. (1997). Alcohol self-administration: further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21(6): 1083–1091.

Hoey LL., Nahum A. y Vance-Bryan K. (1994). A retrospective review and assessment of benzodiazepines in the treatment of alcohol withdrawal in hospitalized patients. *Pharmacotherapy*, 14(5): 572–578.

Hoffman PL. y Tabakoff B. (1994). The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS*, 71: 61–70.

Hoffman PL., Chung CT. y Tabakoff B. (1984). Effects of ethanol, temperature, and endogenous regulatory factors on the characteristics of striatal opiate receptors. *J. Neurochem.* 43: 1003–1010.

Hoffman PL., Urwyler S. y Tabakoff B. (1982). Alterations in opiate re-ceptor function after chronic ethanol exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 222: 182-189.

Holford NH. (1987). Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin. Pharmacokinet.*, 13(5): 273-292.

Holloway FA., Bird DC. y Devenport JA. (1984). Periodic availability: factors affecting alcohol selection in rats. *Alcohol*, 1(1): 19-25.

Hölter SM., Danysz W. y Spanagel R. (1996). Evidence for alcohol anti-craving properties of memantine. *Eur. J. Pharmacol.* 314: R1-R2.

Hölter SM., Landgraf R., Zieggjängsberger W. y Spanagel R. (1997). Time course of acamprosate action on operant ethanol self-administration after ethanol deprivation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21: 862-868.

Homanics GE., Ferguson C., Quinlan JJ., Daggett J., Snyder K., Lagenaur C., Mi ZP., Wang XH, Grayson DR, y Firestone LL. (1997). Gene knockout of the alpha 6 subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor: Lack of effect on responses to ethanol, pentobarbital, and general anesthetics. *Mol. Pharmacol.*, 51: 588-596.

Homanics GE., Le NQ., Kist F., Mihalek RM.; Hart AR. y Quinlan JJ. (1998). Ethanol tolerance and withdrawal responses in GABAA receptor alpha 6 subunit null allele mice and in inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 259-265.

Homanics GE.; Harrison NL., Quinlan JJ., Krasowski MD., Rick CEM., Deblas AL., Metha AK., Kist F., Mihalek RM., Aul JJ. y Firestone LL. (1999). Normal electrophysiological and behavioral responses to ethanol in mice lacking the long splice variant of the g2 subunit of the  $\gamma$  aminobutyrate type A receptor. *Neuropharmacology*, 38: 253-265.

Honkanen A., Vilamom L., Wegelius K., Sarviharjum M., Hyytiam P. y Korpi ER.(1996). Alcohol drinking is reduced by a mu 1- but not by a delta-opioid receptor antagonist in alcohol-preferring rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 304: 7-13.

Horikawa S., Takai T., Toyosato M., Takashashi H., Noda M., Kakidani H., Kubo T., Hirose T., Inamaya S., Hayashida H., Miyata T. y Numa S. (1983). Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature*, 306: 611-614.

Hoyseth KS. y Jones PJ. (1989). Ethanol induced teratogenesis: characterization, mechanisms and diagnostic approaches. *Life Sci.*, 44(10): 643-649.

Hughes J., Smith TW., Kosterlitz H., Forthergill LA., Morgan, BA. y Morris HR. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577-579.

Humeniuk RE., White JM. y Ong J. (1993). The role of GABAB receptors in mediating the stimulatory effects of ethanol in mice. *Psychopharmacology*, 111: 219-224.

Hungund BL., Szakall I., Adam A., Basavarajappa BS. y Vadasz, C. (2003). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, 84: 698-704.

Hurd YL. y Herkenham M. (1992). Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Mol. Brain Res.*, 16: 97-104.

Hutchison WD., Gianoulakis C. y Kalant H. (1988). Effects of ethanol withdrawal on beta-endorphin levels in rat brain and pituitary. *Pharmacol Biochem Behav.*, 30(4): 933-939.

Hynes MD., Lochner MA., Bemis KG. y Hymson DL. (1983). Chronic ethanol alters the receptor binding characteristics of the delta-opioid receptor ligand, D-Ala<sup>2</sup> -D-Leu<sup>5</sup> enkephalin in mouse brain. *Life Sci.*, 33: 2331-2337.



Hyttiä P. y Kiianmaa K. (2001). Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 25(1): 25-33.

Imatoh N., Nakazawa Y., Ohshima H., Ishibashi M. y Yokoyama T. (1986). Circadian rhythm of REM sleep of chronic alcoholics during alcohol withdrawal. *Drug Alcohol Depend.*, 18(1): 77-85.

Imhof A. y Koenig W. (2003). Alcohol inflammation and coronary heart disease. *Addict. Biol.*, 8(3): 271-277

Iwamoto ET. y Martin WR. (1981). Multiple opioid receptors. *Med. Res. Rev.*, 1: 411-440.

Jamensky NT. y Gianoulakis C. (1997). Content of dynorphins and  $\delta$ -opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21: 1455-1464.

James IF. y Goldstein A. (1984). Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity *Mol. Pharmacol.*, 25: 337-342.

Jamshidi N. y Taylor DA. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 134(6): 1151-1154.

Janiri L., Gobbi G., Mannelli P., Pozzi G., Serretti A. y Tempesta E. (1996). Effects of fluoxetine at antidepressant doses on short-term outcome of detoxified alcoholics. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 11(2): 109-117.

Jimenez-Arriero MA., Ponce G., Huidobro A., Rubio G., Archer T. y Palomo T. (1998). Clinical evidence of naltrexone efficacy as an adjunct to the treatment of alcohol dependence. En *Interactive Monoaminergic Disorders*. T.Palomo, RJ. Beninger y T. Archer, eds. Ed Sintesis. Madrid, pp.275-290.

Jingami H., Nakanishi S., Imura H. y Numa S. (1984). Tissue distribution of messenger RNAs coding for opioid peptide precursors and related RNA. *Eur. J. Biochem.*, 142(3): 441-447.

Johnson, BA., O'Malley SS., Ciraulo DA., Roache JD., Chambers RA., Sarid-Segal O. y Couper D. (2003). Dose-ranging kinetics and behavioral pharmacology of naltrexone and acamprosate, both alone and combined, in alcohol-dependent subjects. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 23(3): 281-293.

Kakidani H., Furutani Y., Takashashi H., Noda M., Marimoto Y., Hirose T., Asai M., Inamaya S., Nakanishi S. y Numa S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*, 298: 245-249.

Kalant H. (1971). Absorption, diffusion, distribution and elimination of alcohol: effects on biological membranes. En *The biology of alcoholism*, Vol 1, Biochemistry. Kising B. y Begleiter H., eds, Plenum Press, Nueva York, pp. 1-62.

Kalivas PW., Churchill L. y Klitenick MA. (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 57(4): 1047-1060.

Kang M., Spigelman I., Sapp DW. y Olsen RW. (1996). Persistent reduction of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition in rat hippocampus after chronic intermittent ethanol treatment. *Brain Res.*, 709: 221-228.

Kanterman RY., Mahan LC., Briley EM., Moosma FJ. Jr., Sibley DR., Axelrod J., et al. (1991). Transfected D2 dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release in chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.*, 39: 364-369.

Kapoun AM., Geer BW., Heinstra PW., Corbin V. y McKechnie SW. (1990). Molecular control of the induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster* larvae. *Genetics*, 124(4): 881-888.

Karst H., de Kloet ER. y Joels M. (1999). Episodic corticosterone treatment accelerates kindling epileptogenesis and triggers long-term changes in hippocampal CA1 cells, in the fully kindled state. *Eur. J. Neurosci.*, 11(3): 889-898.

Katner SN., Magalong JG. y Weiss F. (1999). Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacol.*, 20: 471-479.

Katsuki S., Kato J., Nakajima M., Inui N., Sasaki K., Kohgo Y. y Niitsu Y. (1996). Analysis of CA repeats in first intron of class I ADH gene in Long-Evans Cinnamon rats developing fatal intoxication after ethanol intake. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20(1 Suppl):33A-35A

Kebabian J. y Caine D. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277: 93-96.

Khatami S., Hoffman PL., Shibuya T. y Salefsky B. (1987). Selective effect of ethanol on opiate receptor subtypes in brain. *Neuropharmacology*, 26: 1503-1507.

Kieffer BL., Befort K., Gaveriaux-Ruff C. y Hirth CG. (1992). The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 12048-12052.

Kiianmaa K., Nurmi M., Nykanen I. y Sinclair JD. (1995). Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52: 29-34.

Kinoshita H., Jessop DS., Finn DP., Coventry TL., Roberts DJ., Ameno K., Ijiri I. y Harbuz MS. (2000). Acute ethanol decreases NPY mRNA but not POMC mRNA in the arcuate nucleus. *NeuroReport*, 11: 3517-3519.

Kiyatkin, E. A. y Gratton, A. (1994). Electrochemical monitoring of extracellular dopamine in nucleus accumbens of rats lever-pressing for food. *Brain Res.*, 652: 225-234.

Koch T., Brandenburg LO., Liang Y., Schulz S., Beyer A., Schroder H. y Holtt V. (2004). Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *J. Neurochem.*, 88(3): 680-688.

Kohl RR., Katner JS., Chernet E. y McBride WJ. (1998). Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. *Psychopharmacology*, 139: 79-85.

Kokate TG., Cohen AL., Karp E. y Rogawski MA. (1996). Neuroactive steroids protect against pilocarpine- and kainic acid-induced limbic seizures and status epilepticus in mice. *Neuropharmacology*, 35(8): 1049-1056.

Kokate TG., Svensson BE. y Rogawski MA. (1994). Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270(3): 1223-1229.

Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F. Alcohol, the reward system and dependence. *EXS.* 1994;71:103-14.

Koob GF. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 177-184.

Koob GF. y Bloom FE. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242(4879): 715-723.

Kranzler HR., Burleson JA., Korner P., Del Boca FK., Bohn MJ., Brown J. y Liebowitz N. (1995). Placebo-controlled trial of fluoxetine as an adjunct to relapse prevention in alcoholics. *Am. J. Psychiatry*, 152(3): 391-397.

Kranzler HR., Del Boca F., Korner P. y Brown J. (1993). Adverse effects limit the usefulness of fluvoxamine for the treatment of alcoholism. *J. Subst. Abuse Treat.*, 10(3): 283-287.

Krishnan-Sarin, S., Jing, SL., Kurtz, DL., Zweifel, M., Portoghese, PS., Li, TK, Froehlich, JC. (1995a). The delta opioid receptor antagonist nal-trindole attenuates both alcohol and saccharin intake in rats selectively bred for alcohol preference. *Psychopharmacology*, 120(2): 177-185.

Krishnan-Sarin, S., Portoghese, PS., Li, TK. y Froehlich, JC. (1995b). The delta<sub>2</sub>-opioid receptor antagonist naltriben selectively attenuates alcohol intake in rats bred for alcohol preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52: 153-159.

Krishnan-Sarin, S., Wand, GS., Li, XW., Portoghese, PS. y Froehlich, JC. (1998). Effect of mu opioid receptor blockade on alcohol intake in rats bred for high alcohol drinking. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 59: 627-635.

Krnjevic K. (1997). Role of GABA in cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 75, 439-451.

Krystal J.H., Cramer JA., Krol WF., Kirk GF., Rosenheck RA. y Veterans Affairs Naltrexone Comparative Study 425 Group. (2001). Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *N. Engl. J. Med.*, 345(24): 1734-1739.

Kuzmin AV., Semenova S., Gerrits MA., Zvartau EE. y Van Ree JM. (1997). k-Opioid receptor agonist U50,488H modulates cocaine and morphine self-administration in drug-naive rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 321: 265-71.

Laine TP., Ahonen A., Torniainen P., Heikkila J., Pythinen J. Rasanen P., Niemela O. y Hillbom M. (1999). Dopamine transporters increase in human brain after alcohol withdrawal. *Mol. Psychiatry*, 4: 189-191.

Lands WE. (1999). Alcohol, slow wave sleep, and the somatotrophic axis. *Alcohol*, 18(2-3): 109-122.

Le AD. y Chow S. (1992). Reduction of ethanol intake in C57BL/6 mice by opiate receptor antagonists. *Alcohol Alcoholism*, 27(Suppl 1): 49-56.

Le AD., Quan B., Juzytch W., Fletcher PJ., Joharchi N. y Shaham Y. (1998). Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology*, 135: 169–174.

Leadem CA. y Yagenova SV. (1987). Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology*. 45: 109–117.

Lee WK. y Regan TJ. (2002). Alcoholic cardiomyopathy: is it dose-dependent?. *Congest. Heart Fail.*, 8(6): 303–306.

Levesque D., Martres MP., Diaz J., Griffon N., Lammers CH., Sokoloff P. y Schwartz JC. (1995). A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(5): 1719–1723.

Lewis ME., Khachaturian H. y Watson SJ. (1983). Comparative distribution of opiate receptors and three opioid peptide neuronal systems in rhesus monkey central nervous system. *Life Sci.*, 33[Suppl 1]: 239–242.

Li CH. y Chung D. (1976). Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1145–1148.

Li H., Siegel RE, y Schwartz RD. (1993). Rapid decline of GABAA receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus*, 3(4): 527–537.

Li TK. y Lumeng L. (1984). Alcohol preference and voluntary alcohol intakes of inbred rat strains and the National Institutes of Health heterogeneous stock of rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 8: 485–486.

Li TK., Lumeng, L., y Doolittle, DP. (1993). Selective breeding for alcohol preference and associated responses. *Behavior Genetics* 23: 163-170.

Li XW., Li TK. y Froehlich JC. (1998). Enhanced sensitivity of the nucleus accumbens proenkephalin system to alcohol in rats selectively bred for alcohol preference. *Brain Res.*, 794: 35-47.

Li Y., McGivern RF., Nagahara AH. y Handa RJ. (1997). Alterations in the estrogen sensitivity of hypothalamic proenkephalin mRNA expression with age and prenatal exposure to alcohol. *Mol. Brain Res.*, 47(1-2): 215-222.

Lieber CS. (1994). Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann. Med.*, 26(5): 325-330.

Lieberg CS., Teschke R., Hasumura Y. y Decarli LM. (1975). Differences in hepatic and metabolic changes after acute and chronic alcohol consumption. *Fed. Proc.*, 34: 2060-2074.

Lindberg I. y Yang HYT. (1984). Distribution of Met<sup>5</sup> enkephalin-Arg<sup>6</sup>- Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>-immunoreactive peptides in rat brain: Presence of multiple molecular forms. *Brain Res.*, 299: 73-78.

Lindholm S., Werme M., Brene S. y Franck J. (2001). The selective kappa-opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behav. Brain Res.*, 120(2): 137-146.

Lindvall, O. (1979). *The Neurobiology of Dopamine*, eds., A. S. Horn, J. Korf, y L. Oreland, (pp. 319-342). Academic Press.

Lip GY. y Beevers DG. (1995). Alcohol, hypertension, coronary disease and stroke. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22(3): 189-194.

Little HJ. (1991). The role of neuronal calcium channels in dependence on alcohol and other sedatives/hypnotics. *Pharmacol. Ther.*, 50: 347–365.

Littleton J. (1995). Acamprosate in alcohol dependence: how does it work? *Addiction*, 90(9): 1179–1188.

Littleton JM. y Little HJ. (1994). Current concepts of the neurobiology of ethanol dependence. *Addiction*, 89: 1397–1412.

Lovinger DM. y White G. (1991). Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Mol. Pharmacol.*, 40(2): 263–270.

Lucchi L., Ruis RA., Uzamaki H., Govoni S. y Trabucchi M. (1984) Chronic ethanol changes opiate receptor function in rat striatum. *Brain Res.*, 293: 368–371.

Ludwing AM, Wikler A. y Stark LH. (1974). The first drink: Psychobiological aspects of craving. *Archives of General Psychiatry* 30:539–547.

Lundqvist G. (1996). The clinical use of chlormethiazole. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 42 (suppl 92): 113–114.

Madeira MD. y Paula-Barbosa MM. (1999). Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. *Brain Res. Bull.*, 48: 3–22.

Mahan I., Butch R., Monsma, F. y Sibley, D. (1990). Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca<sup>2+</sup> mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* , 87(6): 2196–2200.

Maitra R. y Reynolds JN. (1998). Modulation of GABA(A) receptor function by neuroactive steroids: evidence for heterogeneity of steroid sensitivity of recombinant GABA(A) receptor isoforms. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76(9): 909–920.



Major LF., Ballenger JC., Goodwin FK. y Brown GL. (1977). Cerebrospinal fluid homovanillic acid in male alcoholics: effects of disulfiram. *Biol. Psychiatry*, 12(5): 635-642.

Mansour A., Fox CA., Akil H. y Watson, SJ. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, 18: 22-29.

Mansour A., Fox CA., Burke S., Meng F., Thompson RC., Akil H. y Watson SJ. (1994a) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 350: 412-438.

Mansour A., Fox CA., Meng F., Akil H. y Watson SJ. (1994b). Kappa 1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to kappa receptor binding and prodynorphin mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.*, 5: 124-144.

Mansour A., Fox CA., Thompson RC., Akil H. y Watson SJ. (1994c) mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res.*, 643: 245-265.

Mansour A., Khachaturian H., Lewis ME., Akil H. y Watson SJ. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors, *Trends Neurosci.*, 11(7): 308-314.

Mansour A., Thompson RC., Akil H. y Watson SJ (1993) Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J. Chem. Neuroanat.*, 6: 351-362.

Manzanares J., Corchero J., Romero J., Fernandez-Ruiz JJ., Ramos JA. y Fuentes JA. (1999). Pharmacological and biochemical interactions between opiates and cannabinoids. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20: 287-294.

Marcucella H. (1989). Predicting the amount of ethanol consumed per bout from schedule of access to ethanol. *Animal Learn. Behav.*, 17: 101-112.

Mardones J. y Segovia-Riquelme N. (1983). Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5: 171-178.

Marinelli PW, Kiianmaa K, Gianoulakis C. (2000). Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci.*, 66: 1915-1927.

Markou A., Weiss F., Gold LH., Caine SB., Schulteis G. y Koob GF. (1993). Animal models of drug craving. *Psychopharmacology*, 112 : 163 -182.

Martin WR., Eades CG., Thompson JA., Huppler RE. y Gilbert PE. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-532.

Mason BJ., Goodman AM., Dixon RM., Hameed RH., Hulot T., Wesnes K., Hunter JA. y Boyeson MG. (2002). A pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interaction study of acamprosate and naltrexone. *Neuropsychopharmacology* 27(4): 596-606.

Mc Clearn GE. y Rodgers, DA. (1959). Differences in alcohol preference among inbred strains of mice. *Quarterly J. Stud Alcohol*, 20: 691-695.

McBride WJ. y Li TK. (1998). Animal models of alcoholism: Neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critical Rev. Neurobiol.*, 12: 339-369.

McBride WJ., Chernet E., McKinzie DL., Lumeng L. y Li TK. (1998). Quantitative autoradiography of mu-opioid receptors in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and non-preferring NP rats. *Alcohol*, 16: 317-323.

McCaul ME., Wand GS., Eissenberg T., Rohde CA. y Cheskin LJ. (2000). Naltrexone alters subjective and psychomotor responses to alcohol in heavy drinking subjects. *Neuropsychopharmacology*, 22(5): 480-492.

McKernan RM. y Whiting PJ. (1996). Which GABAA -receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neurosci.*, 19: 139-143.

McLean S., Rothman RB. y Herkenham M. (1986). Autoradiographic localization of mu- and delta-opiate receptors in the forebrain of the rat. *Brain Res.*, 378: 49-60.

Meador-Woodruff JH., Grandy D., van Tol H, Damask SP., Little KY., Civelli O. y Watson SJ. (1994). Dopamine receptor gene expression in the human medial temporal lobe. *Neuropsychopharmacology*, 10(4): 239-248.

Meador-Woodruff JH., Mansour A., Grandy DK., Damask SP., Civelli O. y Watson SJ. Jr. (1992). Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.*, 145(2): 209-212.

Mehta AK. y Ticku MK. (1989). Chronic ethanol treatment alters the behavioral effects of Ro 15-4513, a partially negative ligand for benzodiazepine binding sites. *Brain Res.*, 489(1): 93-100.

Meisch RA. (1977). Ethanol self-administration: Infrahuman studies. In: Thompson, T., y Dews, P.B., eds. *Advances in Behavioral Pharmacology*, Vol. 1. New York: Academic Press., pp. 35-84.

Meisch RA. (1977). Ethanol self-administration: Infrahuman studies. In: Thompson, T., and Dews, P.B., eds. *Advances in Behavioral Pharmacology*. Vol. 1. New York: Academic Press, pp. 35-84.

Meldrum B. (1982). Pharmacology of GABA. *Clin. Neuropharmacol.*; 5(3): 293-316.

Meng F., Xie GX., Thompson RC., Mansour A., Goldstein A., Watson SJ. y Akil H. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 9954-9958.

Middaugh LD., Szumlinski KK., Van Patten Y., Marlowe AL. y Kalivas PW. (2003). Chronic ethanol consumption by C57BL/6 mice promotes tolerance to its interoceptive cues and increases extracellular dopamine, an effect blocked by naltrexone. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 27(12): 1892-1900.

Mihalek RM., Banerjee PK., Korpi ER., Quinlan JJ., Firestone LL., Mi ZP., Lagenauer C., Tretter V., Sieghart W., Anagnostaras SG., Sage JR., Faneslow MS., Guidotti A., Spigelman I., Li A., Delorey TM., Olsen RW. y Homanics GE. (1999). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12905-12910.

Millan MJ. y Emrich HM. (1981). Endorphinergic systems and the response to stress. *Psychother. Psychosom.*, 36: 43-56.

Millerschoen NR. y Riggs DS. (1969). Homeostatic control of plasma osmolality in the dog and the effect of ethanol. *Am. J. Physiol.*, 217(2): 431-437.

Milton GV. y Erickson CK. (1991). Effect of ethanol and disconform on brain met-enkephalin levels in male Sprague-Dawley rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 15: 327.

Ministerio de Sanidad y Consumo (1994). Alcohol y Salud Pública. Dirección General de Salud Pública. Serie de Informes Técnicos 1.

Miyakawa T., Yagi T., Kitazawa H., Yasuda M., Kawai N., Tsuboi K. y Niki H. (1997). Fyn-kinase as a determinat of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function. *Science*, 278(5338): 698-701.

Monsma F., Mahan I, McVittie I, Gerfen C. y Sibley D. (1990). Molecular cloning and expression of a DL dopamine receptor linked to adenylate cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 6723-6727

Moore RY. y Bloom FE. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1: 129-169.

Morrow AL. (1995). Regulation of GABAA receptor function and gene expression in the central nervous system. In: Bradley, R.J. y Harris, R.A., eds. *International Review of Neurobiology*. Vol. 38. New York: Academic Press, pp. 1-41.

Morrow AL., Suzdak PD., Karanian JW. y Paul SM. (1988). Chronic ethanol administration alters gamma-aminobutyric acid, pentobarbital and ethanol-mediated <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake in cerebral cortical synaptoneurosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246(1): 158-164.

Morzorati SL. (1998). VTA dopamine neuron activity distinguishes alcohol-preferring (P) rats from Wistar rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22(4): 854-857.

Moss M. y Burnham EL. (2003). Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.*, 31(4 Suppl): S207-S212.

Muehlberg CW. (1958). The physiological action of alcohol. *J.A.M.A.*, 167: 1842-1845

Myers RD. y Robinson DE. (1999). Mu and D2 receptor antisense oligonucleotides injected in nucleus accumbens suppress high alcohol intake in genetic drinking HEP rats. *Alcohol*, 18: 225-33.

Naranjo CA. y Kadlec KE. (1991). Possible pharmacological probes for predicting and preventing relapse in treated alcoholics. *Alcohol Alcohol. (Suppl.)*, 1: 523-526.

Naranjo CA. y Sellers EM. (1989). Serotonin uptake inhibitors attenuate ethanol intake in problem drinkers. *Recent Dev. Alcohol*, 7: 255-266.

Naranjo CA., Kadlec KE., Sanhueza P., Woodley-Remus D. y Sellers EM. (1990). Fluoxetine differentially alters alcohol intake and other consummatory behaviors in problem drinkers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 47(4): 490-498.

Naranjo CA., Poulos CX., Bremner KE. y Lanctot KL. (1994). Fluoxetine attenuates alcohol intake and desire to drink. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 9(3): 163-172.

Naranjo CA., Sellers EM., Roach CA., Woodley DV., Sanchez-Craig M., Sykora K. (1984). Zimelidine-induced variations in alcohol intake by nondepressed heavy drinkers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 35(3): 374-381.

Narita M., Suzuki T., Funada M., Misawa M. y Nagase H. (1993). Blockade of the morphine-induced increase in turnover of dopamine on the mesolimbic dopaminergic system by k-opioid receptor activation in mice. *Life Sci.*, 52: 397-404.

Nestby P., Schoffemeer AN., Homberg JR., Wardeh G., De Vries TJ., Mulder AH. y Vanderschuren LJ. (1999). Bremazocine reduces unrestrained free-choice ethanol self-administration in rats without affecting sucrose preference. *Psychopharmacology*, 142: 309-317.

Nevo I. y Hamon M. (1995). Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.*, 2: 305-336.

Nie H. y Janak PH. (2003). Comparison of reinstatement of ethanol- and sucrose-seeking by conditioned stimuli and priming injections of allopregnanolone after extinction in rats. *Psychopharmacology*, 168(1-2): 222-228.

Nishio M. y Narahashi T. (1990). Ethanol enhancement of GABA-activated chloride current in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.*, 518(1-2): 283-286.

Noda M., Teranishi Y., Takahashi H., Toyosato M., Notake M., Nakanishi S. y Numa S. (1982). Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature*, 297: 431-434.

Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. (2003). Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet.*, 42(1):1-31.

Nylander I., Hyytiä P., Forsander O. y Terenius L. (1994) Differences between alcohol-preferring (AA) and alcohol-avoiding (ANA) rats in the prodynorphin and proenkephalin systems. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 18: 1272- 1279.

O'Malley SS. (1996). Opioid antagonists in the treatment of alcohol dependence: clinical efficacy and prevention of relapse. *Alcohol Alcoholism*, 31(Suppl 1): 77-81.

Ogilvie K., Lee S. y Rivier C. (1997a). Effect of three different modes of alcohol administration on the activity of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21(3): 467-476.

Ogilvie KM., Lee S. y Rivier C. (1997b). Role of arginine vasopressin and corticotropin-releasing factor in mediating alcohol-induced adrenocorticotropin and vasopressin secretion in male rats bearing lesions of the paraventricular nuclei. *Brain Res.*, 744(1): 83-95.

Oliva JM., Ortiz S, Palomo T. y Manzanares J. (2003). Changes in gene transcription induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. *J. Neurochem.*, 85(1): 94-104.

O'Malley SS., Jaffe AJ., Chang G., Schottenfeld RS., Meyer RE. y Rounsaville B. (1992). Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 49(11): 881-887.

O'Malley SS., Jaffe AJ., Rode S. y Rounsaville B. (1996). Experience of a "slip" among alcoholics treated with naltrexone or placebo. *Am. J. Psychiat.*, 153: 281-283.

Ortiz S. y Manzanares J. (2003). Effects of AM-251 on voluntary ethanol intake and opioid functional activity in brain and pituitary regions of Fawn-Hooded rats. *International*

Meeting on Genes and Environment Interplay in Neuropsychiatric Disorders October 16-20, 2003 Mojacar, Spain.

Oslin D., Liberto JG., O'Brien J., Krois S. y Norbeck J. (1997). Naltrexone as a adjunctive treatment for older patients with alcohol dependence. *Am. J. Ger. Psychiat.*, 5: 324-332.

Overstreet DH., Kampov-Polevoy AB., Rezvani AH., Braun C., Bartus RT. y Crews FT. (1999). Suppression of alcohol intake by chronic naloxone treatment in P rats: tolerance development and elevation of opioid receptor binding. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 23: 1761-1771.

Palasciano G., Portincasa P., Di Ciaula A. y Palmieri V. (1995). Prolonged consumption of moderate doses of alcohol and in vitro gastro-duodenal and ileal contractility in the rat. *Eur. J. Clin. Invest.*, 25(3): 171-175.

Palmer MR. y Hoffer BJ. (1990). GABAergic mechanisms in the electrophysiological actions of ethanol on cerebellar neurons. *Neurochem. Res.*, 15: 145-151.

Palmer MR., van Horne CG., Harlan JT. y Moore EA. (1988). Antagonism of ethanol effects on cerebellar Purkinje neurons by the benzodiazepine inverse agonists Ro 15-4513 and FG 7142: electrophysiological studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247(3): 1018-1024.

Papadakis JA., Ganotakis ES. y Mikhailidis DP. (2000). Beneficial effect of moderate alcohol consumption on vascular disease: myth or reality?. *J. R. Soc. Health.*, 120(1): 11-15.

Patel VA. y Pohorecky LA. (1989). Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. *Alcohol*, 6: 59-63.

Paul SM. y Purdy RH. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J.*, 6: 2311-2322.

Paxinos G. y Watson C. (1986). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, Academic Press



Peppers MP. (1996). Benzodiazepines for alcohol withdrawal in the elderly and in patients with liver disease. *Pharmacotherapy*, 16: 49-58.

Pert CB. y Snyder SH. (1973). Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science*, 179: 1011-1014.

Peters H. y Faulds D. (1994). Tiapride: a review of its pharmacology and therapeutic potential in the facilitation of alcohol withdrawal. *Drugs*, 47: 1-24.

Petrakis IL., Trevisan L., Boutros NN., Limoncelli D., Cooney NL. y Krystal JH. (2001). Effect of tryptophan depletion on alcohol cue-induced craving in abstinent alcoholic patients. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 25(8): 1151-1155.

Peugh J. y Belenko S. (2001). Alcohol, drugs and sexual function: a review. *J. Psychoactive Drugs.*, 33(3): 223-232.

Pfeiffer A., Herz A., Loriaux DL. y Pfeiffer DG. (1985). Central kappa and mu-opiate receptors mediate ACTH-release in rats. *Endocrinology*, 116: 2688-2690.

Phillips TJ., Brown KJ., Burkhart-Kasch S., Wenger C. Kelly MA., Rubinstein M.; Grandy D. y Low MJ. (1998). Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature Neurosci.*, 1: 610-615.

Piano MR. (2002). Alcohol and heart failure. *J. Card. Fail.*, 8(4): 239-246.

Pirola RC. (1978). *Drug Metabolism and alcohol*. University Park Press. Baltimore.

Plotkin SR., Banks WA. y Kastin AJ. (1998). Enkephalin, PPE mRNA, and PTS-1 in alcohol withdrawal seizure-prone and -resistant mice. *Alcohol*, 15(1): 25-31.

Plotkin SR., Banks WA., Cohn CS. y Kastin AJ. (2001). Withdrawal from alcohol in withdrawal seizure-prone and -resistant mice: evidence for enkephalin resistance. *Pharmacol Biochem Behav.*, 68(3): 379-387.

Plotkin SR., Banks WA., Waguespack PJ. y Kastin AJ. (1997). Ethanol alters the concentration of Met-enkephalin in brain by affecting peptide transport system-1 independent of preproenkephalin mRNA. *J. Neurosci. Res.*, 48(3): 273-280.

Pohorecky LA. y Brick J. (1988). Pharmacology of ethanol. *Pharmac. Ther.* 36:335-427.

Poncelet M., Maruani J., Calassi R. y Soubrie P. (2003). Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB<sub>1</sub> receptor deleted mice. *Neuroscience Let.*, 12(343): 216-218.

Proctor WR. y Dunwiddie TV. (1995). Ethanol increases GABAA receptor-mediated currents in cerebellar Purkinje neurons in rat brain slices. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21: 2100.

Proctor WR., Allan AM. y Dunwiddie TV. (1992a). Brain region-dependent sensitivity of GABAA receptor-mediated responses to modulation by ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16(3): 480-489.

Proctor WR., Soldo BL., Allan AM. y Dunwiddie TV. (1992b). Ethanol enhances synaptically evoked GABAA receptor-mediated responses in cerebral cortical neurons in rat brain slices. *Brain Res.*, 595(2): 220-227.

Przewlocka B., Lason W. y Przewlocki R. (1994). Repeated ethanol differently affects opioid peptide biosynthesis in the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, 60(3): 331-336.

Quinlan JJ., Homanics GE. y Firestone LL. (1998). Anesthesia sensitivity in mice that lack the  $\beta 3$  subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor. *Anesthesiology*, 88: 775-780.

Quintanilla ME., Callejas O. y Tampier L. (2001). Differences in sensitivity to the aversive effects of ethanol in low-alcohol drinking (UChA) and high-alcohol drinking (UChB) rats. *Alcohol*, 23(3):177-182

Rabe CS. y Tabakoff B. (1990). Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.*, 38(6): 753-757.

Ragland G. (1990). Electrolyte abnormalities in the alcoholic patient. *Emerg. Med. Clin. North Am.*, 8(4): 761-773.

Rasmussen DD., Bryant CA., Boldt BM., Colasurdo EA., Levin N. y Wilkinson CW. (1998). Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 789-801.

Reynolds JN., Prasad A. y MacDonald JF. (1992). Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl<sup>-</sup> currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.*, 224(2-3): 173-181.

Rezvani AH., Overstreet DH. y Janowsky DS. (1990). Genetic serotonin deficiency and alcohol preference in the Fawn Hooded rats. *Alcohol Alcohol.*, 25: 573-575.

Rezvani AH., Overstreet DH. y Janowsky DS. (1991). Drug-induced reductions in ethanol intake in alcohol preferring and Fawn-Hooded rats. *Alcohol Alcohol., Suppl. 1.*: 433-437.

Richter CP. y Campbell, KH. (1940). Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science*, 91: 507-509.

Risinger FO. y Cunningham CL. (1998). Ethanol-induced conditioned taste aversion in BXD recombinant inbred mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22: 1234-1244.

Risinger FO., Brown MM., Oakes RA. y Love JA. (1999). Effects of haloperidol or SCH-23390 on ethanol-induced conditioned taste aversion. *Alcohol* 18: 139-145.

Risinger FO., Freeman PA., Greengard P. y Fienberg AA (2001). Motivational effects of ethanol in DARP-32 knock-out mice. *J. Neurosci.*, 21: 340-348.

Risinger FO., Freeman PA., Rubinstein M., Low MJ. y Grandy DK. (2000). Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology*, 152: 343-350.

Rivier C. (1996). Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20(2): 240-254.

Rivier C. y Lee S. (1996). Acute alcohol administration stimulates the activity of hypothalamic neurons that express corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Brain Res.*, 726(1-2): 1-10.

Rivier C. y Lee S. (1996). Acute alcohol administration stimulates the activity of hypothalamic neurons that express corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Brain Res.*, 726(1-2): 1-10.

Rivier C., Bruhn T. y Vale W. (1984) Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: Role of corticotropin-releasing factor (CRF). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229: 127-131.

Robbins, T. W, Cador, M., Taylor, J. R. y Everitt, B. J. (1989). Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 13: 155-162.

Robbins, T. W. y Everitt, B. J. (1996). Neurobehavioral mechanisms of rewards and motivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 6: 228-236.

Roberts AJ. y Keith LD. (1995). Corticosteroids enhance convulsion susceptibility via central mineralocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology*, 20(8): 891-902.

Roberts AJ., McDonald JS., Heyser CJ., Kieffer BL., Matthes HW., Koob GF. y Gold LH (2000). mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293: 1002–1008.

Rodgers-Neame NT., Isenberg KE. y Zorumski CF. (1995). Ethanol augments GABA-induced chloride currents in cultured hippocampal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21: 1814.

Rodrigo R., Thielemann L., Olea M., Munoz P., Cereceda M. y Orellana M. (1998). Effect of ethanol ingestion on renal regulation of water and electrolytes. *Arch. Med. Res.*, 29(3): 209–218.

Rodriguez de Fonseca F, Roberts AJ, Bilbao A, Koob GF, Navarro M. (1999). Cannabinoid receptor antagonist SR141716A decreases operant ethanol self administration in rats exposed to ethanol-vapor chambers. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.*, 20(12):1109–1114.

Rodriguez-Trelles FA. (1984). The neurotransmitter inhibitor GABA, the basis of the mechanism of action of several drugs affecting the central nervous system. *An. R. Acad. Nac. Med. (Madr).*; 101(4): 431–452.

Roehrs T. y Roth T. (2001). Sleep, sleepiness, sleep disorders and alcohol use and abuse. *Sleep Med. Rev.*, 5(4): 287–297.

Roehrs T., Burduvali E., Bonahoom A., Drake C. y Roth T. (2003). Ethanol and sleep loss: a "dose" comparison of impairing effects. *Sleep*, 26(8): 981–985.

Roman PM. (1988). Biological features of women's alcohol use: a review. *Public Health Rep.*, 103(6): 628–637.

Romeo E., Bracanti A., Delorenzo A., Fucci P., Furnari C., Pompili E., Ssaao GF., Spalletta G., Troisi, A. y Pasini, A. (1996). Marked decrease of plasma neuroactive steroids during alcohol withdrawal. *Clin. Neuropharmacol.*, 19: 366–369.

Rosen JB., Cain CJ., Weiss SR. y Post RM. (1992). Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.*, 15: 247-255.

Rossetti ZL., Hmaidan Y. y Gessa GL. (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 221: 227-234.

Rossetti ZL., Isola D., De Vry J. y Fadda F (1999). Effects of nimodipine on extracellular dopamine levels in the rat nucleus accumbens in ethanol withdrawal. *Neuropharmacology*, 38: 1361-1369.

Rossier J., French ED., Rivier C., Ling N., Guillemin R. y Bloom FE. (1977) Foot-shock induced stress increases beta-endorphin levels in blood but not brain. *Nature*, 270: 618-620.

Roth R. y Elsworth J. (1995). Biochemical pharmacology of midbrain dopamine neurons. In: Bloom F, Kupfer D, Eds. *Psychopharmacology: Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York, pp. 227-244.

Rothblat DS., Rubin E. y Schneider JS. (2001). Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci. Lett.*, 300: 63-66.

Rothman RB., Long JB., Bykov V., Brady LS., Jacobson AE., Rice KC. y Holaday JW. (1990). Pretreatment of rats with the irreversible  $\mu$ -receptor antagonist beta-FNA, fails to prevent naltrexone-induced upregulation of  $\mu$ -opioid receptor. *Neuropharmacology*, 29(9): 805-810.

Roy A., Adinoff B., DeJong J. y Linnoila M. (1991). Cerebrospinal fluid variables among alcoholics lack seasonal variation. *Acta Psychiatr. Scand.*, 84(6): 579-582.

Rubin E. y Lieber CS. (1968). Hepatic microsomal enzymes in man and rat: induction and inhibition by ethanol. *Science*, 162: 690-691.

Rudolph JG., Walker DW., Iimuro Y., Thurman RG. y Crews FT. (1997). NMDA receptor binding in adult rat brain after several chronic ethanol treatment protocols. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21(8): 1508-1519.

Sacanella E. y Estruch R. (2003). The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict. Biol.*, 8(4): 371-378.

Saitz R., Mayo-Smith MF., Roberts MS., Redmond HA., Bernard DR. y Calkins DR. (1994). Individualized treatment for alcohol withdrawal. A randomized double-blind controlled trial. *JAMA*, 272(7): 519-523.

Saland LC., Abeyta A., Frausto S., Raymond-Stintz M., Hastings CM., Carta M., Valenzuela CF. y Savage DD. (2004). Chronic ethanol consumption reduces [delta]- and  $\mu$ -opioid receptor-stimulated G-protein coupling in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 28(1): 98-104.

Salomone, J. D., Cousins, M. S., McCullough, L. D., Carrier, O. D. L. y Berkowitz, R. J. (1994). Nucleus accumbens dopamine release increases during instrumental lever pressing for food but not free food consumption. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 25-31.

Samson HH. (1986). Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 10: 436-442.

Samson HH. y Doyle TF. (1985). Oral ethanol self-administration in the rat: effect of naloxone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22:91-99.

Samson HH. y Harris RA. (1992). Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 206-211.

Samson HH. y Hodge, CW. (1996). Neurobehavioral regulation of ethanol intake. In: Deitrich, R.A., and Erwin, V.G., eds. *Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 203–226.

Samson HH., Tolliver GA., Haraguchi M. y Hodge CW. (1992). Alcohol self-administration: role of mesolimbic dopamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 654: 242–253.

Sandi C., Borrell J. y Guaza C. (1988). Involvement of kappa type opioids on ethanol drinking. *Life Sci.*; 42(10): 1067–1075.

Sandi C., Borrell J. y Guaza C. (1990). Effects of the kappa opioid receptor antagonist MR-2266-BS on the acquisition of ethanol preference. *Life Sci*, 46(16): 1119–1129.

Scanlon MN., Lazar-Wesley E., Grant KA. y Kunos G. (1992). Proopiomelanocortin messenger RNA is decreased in the mediobasal hypothalamus of rats made dependent on ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 16(6): 1147–1151.

Scharf RE. y Aul C. (1988). Alcohol-induced disorders of the hematopoietic system. *Z Gastroenterol.*, 26 (Suppl 3): 75–83.

Schoffelmeer AN., Rice KC., Jacobson AE., Van Gelderen JG., Hogenboom F., Heijna MH. y Mulder AH. (1988). Mu-, delta- and kappa-opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur. J. Pharmacol.*, 154: 169–178.

Schridde U. y Van Luijcklaar G. (2004). Corticosterone increases spike-wave discharges in a dose- and time-dependent manner in WAG/Rij rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 78(2): 369–375.

Schuckit MA., Tipp JE., Reich T., Hesselbrock VM. y Bucholz KK. (1995). The histories of withdrawal convulsions and delirium tremens in 1648 alcohol dependent subjects. *Addiction*, 90: 1335–1347.



Schulz, R., Wijster, M., Duka, T. y Herz, A. (1980) Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology*, 68: 221-227.

Seizinger BR., Bovermann K., Holtt V. y Herz A. (1984a). Enhanced activity of the endorphinergic system in the anterior and neurointermediate lobe of the pituitary gland after chronic treatment with ethanol liquid diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230: 455-461.

Seizinger BR., Bovermann K., Maysinger D., Holtt V. y Herz A. (1983). Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide systems in discrete regions of rat brain and pituitary. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18 (Suppl 1): 361-369.

Seizinger BR., Holtt V. y Herz A. (1984b). Effect of chronic ethanol treatment on the in vitro biosynthesis of pro-opiomelanocortin and its post-translational processing to  $\beta$ -endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *J Neurochem.*, 43: 607-613.

Sesso HD. (2001). Alcohol and cardiovascular health: recent findings. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 1(3): 167-172.

Shaw GK., Waller S., Majumdar SK., Alberts JL., Latham CJ. y Dunn G. (1994). Tiapride in the prevention of relapse in recently detoxified alcoholics. *Brit. J. Psychiat.*, 165: 515-523.

Shen RY. y Chiodo LA. (1993). Acute withdrawal after repeated ethanol treatment reduces the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.*, 622: 289-293.

Sherman JE., Jorenby DE. Y Baker TB. (1988). Classical conditioning with alcohol: Acquired preferences and aversions, tolerance, and urges/cravings. In: Chaudron, C.D., and Wilkinson, D.A., eds. *Theories on Alcoholism*. Toronto: Addiction Research Foundation, pp. 173-237.

Shippenberg TS., LeFevour A. y Heidbreder C. (1996).  $\kappa$ -Opioid receptor agonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276: 545–554.

Sim LJ., Selley DE., y Childers SR. (1995). In vitro autoradiography of receptor-activated G-proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5' [g-[<sup>35</sup>S]thio]-triphosphate binding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92: 7242–7246.

Simon EJ., Hiller J. y Edelman Y. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1947–1949.

Sim-Selley LJ., Sharpe AL., Vogt LJ., Brunk LK., Selley DE. y Samson HH. (2002). Effect of ethanol self-administration on mu- and delta-opioid receptor-mediated G-protein activity. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26: 688–694.

Sinclair JD. (1971). The alcohol-deprivation effect in monkeys. *Psychonomical Science* 25: 21–24.

Skinner BF. (1938). *The Behavior of Organisms*. New York: Appleton-Century-Crofts.

Sklar LS. y Amit Z. (1977). Manipulations of catecholamine systems block the conditioned taste aversion induced by self-administered drugs. *Neuropharmacology*, 16: 649–655.

Slawecki CJ., Hodge CW. y Samson HH. (1997). Dopaminergic and opiate agonists and antagonists differentially decrease multiple schedule responding maintained by sucrose/ethanol and sucrose. *Alcohol*, 14(3): 281–294.

Smith SG., Werner TE. y Davis WM. (1976). Comparison between intravenous and intragastric alcohol self-administration. *Physiol. Psychol.* 4: 91–93.

Soini SL., Honkanen A., Hyytia P. y Korpi ER. (1999). [3H] ethylketocyclazocine binding to brain opioid receptor subtypes in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol*, 18(1): 27-34.

Soini SL., Ovaska T., Honkanen A., Hyytia P. y Korpi ER. (1998). Brain opioid receptor binding of [<sup>3</sup>H] CTOP and [<sup>3</sup>H] naltrindole in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol*, 15: 227-232.

Sokoloff P., Giros B., Martres M., Bouthenet M. y Sdlwartz JC. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347: 146-151.

Soldo BL., Proctor WR. y Dunwiddie TV. (1994). Ethanol differentially modulates GABAA receptor-mediated chloride currents in hippocampal, cortical, and septal neurons in rat brain slices. *Synapse*, 18(2): 94-103.

Solomon J., Rouck LA. y Koepke HH. (1983). Double-blind comparison of lorazepam and chlordiazepoxide in the treatment of the acute alcohol abstinence syndrome. *Clin. Ther.*, 6(1): 52-58.

Sournia JCH. (1990). *A history of Alcoholism*. Basil Blackwell Ltd, London.

Soyka M. y Preuss U. (2003). Glutamatergic mechanisms in alcohol dependence--genetic, molecular-biological and neuropharmacological findings. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.*, 71 (Suppl 1): S45-50.

Spagnolo A. (1993). Teratogenesis of alcohol. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 29(1): 89-96.

Spanagel R. (1996). The influence of opioid antagonists on the discriminative stimulus of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 645-649.

Spanagel R. y Höltter SM. (1999). Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: An animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol.*, 34: 231–243.

Spanagel R. y Höltter SM. (2000). Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J. Neural Trans.*, 107: 669–680.

Spanagel R. y Zieglgänsberger W. (1997). Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 54–59.

Spanagel R., Herz A. y Shippenberg TS. (1990). The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: An in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, 55: 1734–1740.

Spanagel R., Herz A. y Shippenberg TS. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(6): 2046–2050.

Stefanini E., Frau M., Garau MG., Garau B., Fadda F. y Gessa GL. (1992). Alcohol-preferring rats have fewer dopamine D2 receptors in the limbic system. *Alcohol Alcohol.*, 27(2): 127–130.

Stermer E. (2002). Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. *Isr. Med. Assoc. J.* 4(3): 200–202.

Stewart J. y de Wit H. (1987). Reinstatement of drug-seeking behavior as a method of assessing incentive motivational properties of drugs. In: Bozarth, MA., ed. *Method of Assessing the Reinforcing Properties of Abused Drugs*. New York: Springer, pp. 211–227.

Stewart RB., McBride WJ., Lumeng L., Li TK. y Murphy JM. (1991). Chronic alcohol consumption in alcohol-preferring P rats attenuates subsequent conditioned taste aversion produced by ethanol injections. *Psychopharmacology*, 105(4): 530–534.

Stubbs CD. y Slater SJ. (1999). Ethanol and protein kinase C. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23: 1552–1560.

Suzdak PD., Glowa JR., Crawley JN., Schwartz RD., Skolnick P. y Paul SM. (1986). A selective imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science*, 234(4781): 1243–1247.

Svingos AL., Clarke CL. y Pickel VM. (1998). Cellular sites for activation of  $\delta$ -opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: Relationship with Met-enkephalin. *J. Neurosci.*, 18: 1923–1933.

Svingos AL., Moriwaki A., Wang JB., Uhl GR. y Pickel VM. (1996). Ultrastructural immunocytochemical localization of mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens: Extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. *J. Neurosci.*, 16(13): 4162–4173.

Svingos AL., Moriwaki A., Wang JB., Uhl GR. y Pickel VM. (1997). mu-Opioid receptors are localized to extrasynaptic plasma membranes of GABAergic neurons and their targets in the rat nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, 17(7): 2585–2594.

Swift RM. (1995). Effect of naltrexone on human alcohol consumption. *J. Clin. Psychiat.*, 56 (Suppl., 7): 24–29.

Swift RM., Whelihan W., Kuznetsov O., Buongiorno G. y Hsuing H. (1994). Naltrexone-induced alterations in human ethanol intoxication. *Am. J. Psychiat.*, 151: 1463–1467.

Tabakoff B. y Hoffman PL. (1983). Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.*, 32: 197–204.

Tabakoff B. y Hoffman PL. (1988). A neurobiological theory of alcoholism. In: Chaudron, C.D. y Wilkinson D.A., eds. *Theories on Alcoholism*. Toronto : Addiction Research Foundation, pp. 29–72.

Tabakoff B. y Hoffman, PL. (1996). Alcohol and glutamate receptors. In: Deitrich, R.A., y Erwin, V.G., eds. *Pharmacological Effects of Alcohol on the Nervous System*. New York: CRC Press, pp. 73-93.

Tabakoff B., Urwyler S. y Hoffman PL. (1981). Ethanol alters kinetic characteristics and function of striatal morphine receptors. *J. Neurochem.*, 37: 518-521.

Taniguchi N. y Kaneko S. (1997). Alcoholic effect on male sexual function. *Nippon Rinsho*, 55(11): 3040-3044.

Teh SH., O'Riordain DS. y O'Connell PR. (1998). Colonic pseudo-obstruction following acute pancreatitis. *Ir. J. Med. Sci.*, 167(1): 41-42.

Tempel A., Kessler JA. y Zukin RS. (1990). Chronic naltrexone treatment increases expression of preproenkephalin and preprotachykinin mRNA in discrete brain regions. *J. Neurosci.*, 10(3): 741-747.

Tempesta E., Janiri L., Bignamini A., Chabac S. y Potgieter A. (2000). Acamprosate and relapse prevention in the treatment of alcohol dependence: A placebo-controlled study. *Alcohol Alcohol.*, 35: 202-209.

Terenius L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32: 317-320.

Teschke R., Matsuzaki S., Ohnishi K., Hasumura Y. y Lieber CS. (1977). Metabolism of alcohol at high concentrations: role and biochemical nature of the hepatic microsomal oxidizing system. En *Alcohol Intoxication and Withdrawal IIIa.*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 85A. Gross MM., ed, Plenum Press, Nueva York, pp. 257-280.

Teyssen S. y Singer MV. (2003). Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17(4): 557-573.

Thase ME., Salloum IM. y Cornelius JD. (2001). Comorbid alcoholism and depression: treatment issues. *J. Clin. Psychiatry*, 62 (Supl 20): 32-41.

Thiagarajan AB., Mefford IN. y Eskay RL. (1989). Single-dose ethanol administration activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: exploration of the mechanism of action. *Neuroendocrinology*, 50(4): 427-432

Thiele TE., Willis B., Stadler J., Reynolds JG., Bernstein IL. y McKnight GS. (2000). High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice. *J. Neurosci.*, 20(10): RC75.

Thompson RC., Mansour A., Akil H. y Watson SJ. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron*, 11: 903-913.

Tierney S., Qian Z., Lipsett PA., Pitt HA. y Lillemoe KD. (1998). Ethanol inhibits sphincter of Oddi motility. *J. Gastrointest. Surg.*, 2(4): 356-362.

Tremwel MF., Anderson KJ. y Hunter BE. (1994). Stability of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding sites following chronic ethanol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 18(4): 1004-1008.

Tsai G. y Coyle JT. (1998). The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu. Rev. Med.*, 49: 173-184.

Turchan J., Przewlocka B., Toth G., Lason W., Borsodi A. y Przewlocki R. (1999). The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neurosci.*, 91: 971-977.

Tzschentke TM. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: A comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.*, 56: 613-672.

Ueno Y, Fukunaga T, Mizoi Y, Adachi J, Fujiwara S. (1990). A pharmacokinetic study of ethanol elimination--first pass metabolism and elimination rate. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison.*, 25(2):103-115.

Ulm RR., Volpicelli JR. y Volpicelli, LA. (1995). Opiates and alcohol self-administration in animals. *J. Clin. Psychiatry.* 56 (Suppl. 7): 5-14.

Valenzuela CF., Machu TK., McKernan RM., Whiting P., VanRenterghem BB., McManaman JL., Brozowski SJ., Smith GB., Olsen RW. y Harris RA. (1995). Tyrosine kinase phosphorylation of GABAA receptors. *Mol. Brain Res.*, 31(1-2): 165-172.

Vallar I. y Meldolesi J. (1989). Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10: 74-77.

Valverius P., Crabbe JC., Hoffman PL. y Tabakoff B. (1990). NMDA receptors in mice bred to be prone or resistant to ethanol withdrawal seizures. *Eur. J. Pharmacol.*, 184(1): 185-189.

Van Tol HH., Bunzow JR., Guan HC., Sunahara RK., Seeman P., Niznik HB. y Civelli O. (1991). Cloning of a human dopamine D4 receptor gene with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319): 614-619.

Verbanck P., Seutin V., Dresse A., Scuvee J., Massotte L., Giesbers I. y Kornreich C. (1990). Electrophysiological effects of ethanol on monoaminergic neurons: an in vivo and in vitro study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 14(5): 728-735. Versteeg DH., Van Der Gugten J., De Jong W. y Palkovits M. (1976). Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat brain. *Brain Res.*, 113(3): 563-574.

Victor M. y Adams RD. (1953). The effect of alcohol on the nervous system. In: *Metabolic and Toxic Diseases of the Nervous System*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, pp. 526-573.



Volpicelli JR. (1987). Uncontrollable events and alcohol drinking. *Br. J. Addict.*, 82: 381–392.

Volpicelli JR., Alterman AI., Hayashida M. y O'Brien CP. (1992). Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* 49: 876–880.

Volpicelli JR., Davis MA. y Olgin JE. (1986). Naltrexone blocks the post-shock increase of ethanol consumption. *Life Sci.*, 38(9): 841–847.

Volpicelli JR., Watson NT., King AC., Sherman CE. y O'Brien CP. (1995). Effect of naltrexone on alcohol "high" in alcoholics. *Am. J. Psychiatry*, 152: 613–615.

Wamsley JK., Young WSD. y Kuhar MJ. (1980). Anatomical localization of enkephalin immunoreactive sites in rat forebrain. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 22: 257–270.

Wand CS. (1990). Differential regulation of anterior pituitary corticotrope function is observed in vivo but not in vitro in two lines of ethanol sensitive mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 14: 100–1006.

Wang G., Liu J., Harvey-White J., Zimmer A. y Kunos G. (2003). Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age dependent decline in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100: 1393–1398.

Wang JB., Imai Y., Eppler CM., Gregor P., Spivak CE. y Uhl GR. (1993).  $\mu$  opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90: 10230–10234.

Wartburg JP. von. (1971). The metabolism of alcohol in normals and alcoholics: enzymes. En *The biology of alcoholism*, Vol 1, Biochemistry. Kising B. y Begleiter H., eds, Plenum Press, Nueva York, pp. 63–102.

Watson WP. y Little HJ. (1995). Identification of distinct components, with different time courses, of the changes in response to convulsive stimuli during alcohol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272: 876–884.

Watson WP., Misra A., Cross AJ., Green AR. y Little HJ. (1994). The differential effects of felodipine and nitrendipine on cerebral dihydropyridine binding *ex vivo* and the ethanol withdrawal syndrome in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 112(4): 1017–1024.

Wehner JM. y Bowers BJ. (1995). Use of transgenics, null mutants, and antisense approaches to study ethanol's actions. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 19: 811–820.

Weinshenker D., Rust NC., Miller NS. y Palmiter RD. (2000). Ethanol-associated behaviors of mice lacking norepinephrine. *J. Neurosci.*, 20(9):3157–3164.

Weiss F. (2000). Neuroadaptive changes in neurotransmitter systems mediating ethanol-induced behaviors. En *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph No. 34* (Norhona, A, Eckardt, M, Warren, K, eds) pp 261–313. National Institutes of Health Publication No. 00–4520, Bethesda, MD.

Weiss F., Lorang MT., Bloom FE. y Koob GF. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267: 250–258.

Weiss F., Mitchiner M., Bloom FE. y Koob GF. (1990). Free-choice responding for ethanol versus water in alcohol preferring (P) and unselected Wistar rats is differentially modified by naloxone, bromocriptine, and methysergide. *Psychopharmacology*, 101: 178–186.

Weiss F., Parsons LH., Schulteis G., Lorang MT., Hyytiä P., Bloom FE. y Koob GF. (1996). Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and serotonin release in dependent rats. *J. Neurosci.*, 16: 3474–3485.

Whittington MA. y Little HJ. (1991). Nitrendipine, given during drinking, decreases the electrophysiological changes in the isolated hippocampal slice, seen during ethanol withdrawal. *Br. J. Pharmacol.*, 103(3): 1677-1684.

Whittington MA., Butterworth AR., Dolin SJ., Patch TL. y Little HJ. (1992). The effects of chronic treatment with the dihydropyridine, Bay K 8644, on hyperexcitability due to ethanol withdrawal, in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 105(2): 285-292. Whittington MA., Dolin SJ., Patch TL., Siarey RJ., Butterworth AR. y Little HJ. (1991). Chronic dihydropyridine treatment can reverse the behavioural consequences of and prevent adaptations to, chronic ethanol treatment. *Br. J. Pharmacol.*, 103(3): 1669-1676.

Whittington MA., Lambert JD. y Little HJ. (1995). Increased NMDA receptor and calcium channel activity underlying ethanol withdrawal hyperexcitability. *Alcohol Alcohol.*, 30(1): 105-114.

Wilde MI. y Wegstaff AJ. (1997). Acamprosato. *Drugs*, 53: 1038-1053.

Williams D. y McBride AJ. (1998). The drug treatment of alcohol withdrawal symptoms: a systematic review. *Alcohol Alcohol.*, 33: 103-115.

Williams KL. y Woods JH. (1998). Oral ethanol-reinforced responding in rhesus monkeys: effects of opioid antagonists selective for the mu-, kappa- or delta-receptor. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22: 1634-1639.

Williams-Hemby I y Porrino L. (1997). Functional consequences of intragastrically administered ethanol in rats as measured by the 2-[<sup>14</sup>C]deoxyglucose method. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 21: 1573-1580.

Wise RA. y Bozarth MA. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.*, 94: 469-492.

Wise RA. y Rompre PP. (1989). Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* 40: 191–225.

World Drink Trends (1996). Produktschap voor gedistilleerde dranken/NTC Pub Ltd. Henley-Thames.

Wu JM., Wang ZR., Hsieh TC., Bruder JL., Zou JG. y Huang YZ (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int. J. Mol. Med.*, 8(1): 3–17.

Xi ZX., Fuller SA. y Stein EA. (1998). Dopamine release in the nucleus accumbens during heroin self-administration is modulated by  $\kappa$ -opioid receptors: an in vivo fast-cyclic voltammetry study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284: 151–161.

Yaksh TL. y Rudy TA. (1978). Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*, 4: 299–359.

Yasuda K., Raynor K., Kong H., Breder CD., Takeda J., Reisine T. y Bell GI. (1993). Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6736–6740.

Yim HI. y Gonzales RA. (2000). Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol*, 22: 107–115.

Yim HJ., Schallert T., Randall PK. y Gonzales RA. (1998). Comparison of local and systemic ethanol effects on extracellular dopamine concentration in rat nucleus accumbens by microdialysis. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 367–374.

Yoshikawa K., Williams C. y Sabol SI. (1984). Rat brain preproenkephalin mRNA. cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 259: 14301–14308.

Yoshimoto K., McBride WJ., Lumeng L. y Li TK. (1992a). Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. *Alcohol*, 9(1): 17-22.

Yoshimoto K., McBride WJ., Lumeng L. y Li TK. (1992b). Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16(4): 781-785.

Yost DA. (1996). Alcohol withdrawal syndrome. *American Family Physician* 54: 657-664.

You M., Fischer M., Deeg MA. y Crabb DW. (2002). Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.*, 277(32): 29342-29347.

Young III S., Bonner T. y Brann M. (1986). Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 9827-9831.

Young WS<sup>3rd</sup>. y Lightman SL. (1992). Chronic stress elevates enkephalin expression in the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Mol Brain Res.*, 13(1-2): 111-117.

Zangen A. y Shalev, U. (2003). Nucleus accumbens [beta]-endorphin levels are not elevated by brain stimulation reward but do increase with extinction. *Eur. J. Neurosci.*, 17(5): 1067-1072.

Zhang I., Lachowicz J. y Sibley D. (1994). The D2s and D2I. dopamine receptor isoforms are differentially regulated in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol. Pharmacol.*, 45: 878-89.

Zhou Y., Franck J., Spangler R., Maggos CE., Ho A. y Kreek MJ. (2000). Reduced hypothalamic POMC and anterior pituitary CRF1 receptor mRNA levels after acute, but not chronic, daily "binge" intragastric alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res.*, 24(10): 1575-1582.

Zoeller RT. y Rudeen PK. (1992). Ethanol blocks the cold-induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold-induced increase in thyrotropin. Mol. Brain Res., 13(4): 321-330.